

FINALIDADE

Sistema colorimétrico para determinação do fósforo inorgânico. **Somente para uso diagnóstico in vitro.**

PRINCÍPIO

O fósforo inorgânico reage com molibdato em meio ácido, formando um complexo fosfomolibdato. A adição de uma solução alcalina permite que esse complexo seja reduzido pelo Ácido Ascórbico, dando origem a um novo complexo fosfomolibdato de cor azul. Paralelamente, as proteínas anteriormente precipitadas se dissolvem.

PARTICULARIDADES DO SISTEMA

Fosfato Doles é método prático, de alta precisão, para dosagem do fósforo inorgânico. Baseia-se numa simplificação das técnicas de Gomori e Baginski. Os reagentes são estáveis. Utiliza-se 100µL de soro e o tempo total gasto é inferior a 5 minutos.

METODOLOGIA

Gomori modificado.

REAGENTES

Ácido Ascórbico: frasco contendo 2g de Ácido Ascórbico. Após reconstituição, tem-se uma solução 0,084M de Ácido Ascórbico.

Reagente molibdato: solução 0,018M de Molibdato de Amônio em Ácido Sulfúrico 1,5M.

Solução alcalina: solução 16M de Monoetanolamina.

Solução padrão 5mg/dL: solução aquosa contendo 5mg/dL de fósforo.

APRESENTAÇÃO

Ácido Ascórbico	2 x	2g
Reagente molibdato	1 x	90mL
Solução alcalina	1 x	45mL
Solução padrão 5mg/dL	1 x	3mL

NÚMERO DE TESTES

90 testes

EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

- Espectrofotômetro ou fotocolorímetro capaz de medir a absorvância em **660nm** ou **filtro vermelho**.
- Tubos de ensaio.
- Pipetas graduadas.
- Pipetas semiautomáticas 100µL.
- Frasco de vidro âmbar com capacidade para 150mL.
- Cronômetro.
- Ponteiras descartáveis.
- Água deionizada.

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Ácido Ascórbico: armazenar à temperatura de 20-30°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, se obedecidas as condições de armazenamento.

Ácido Ascórbico 0,084M - solução de uso: armazenar em frasco âmbar, ao abrigo da luz, sob refrigeração (2-8°C). Estável por 1 ano após sua reconstituição, se obedecidas as condições de preparo e armazenamento.

Reagente molibdato: armazenar à temperatura de 20-30°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, se obedecidas as condições de armazenamento.

Solução alcalina: armazenar à temperatura de 20-30°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, se obedecidas as condições de armazenamento.

Solução padrão 5mg/dL: armazenar à temperatura de 20-30°C. Após aberto conservar entre 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**. Seu manuseio deve ser cuidadoso, evitando-se contato com pele e mucosas. Os reagentes contêm material cáustico. Caso ocorra 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, plasma (colhido com heparina), urina, líquido amniótico. Estável por 2 dias, à temperatura de 20-30°C, ou 7 dias, entre 2-8°C. Se congelada (20°C negativos), a amostra permanece estável por 3 meses.

O sangue deve ser colhido com o mínimo de estase. Separar imediatamente o soro ou plasma (máximo 1 hora).

Evitar hemólise, pois o fósforo inorgânico encontra-se sete vezes mais concentrado nos eritrócitos do que no plasma. Além disso, a hemoglobina interfere na reação.

A amostra urinária deverá ser coletada durante 24 horas. Separar uma parte dessa amostra (20mL) e acidificar com ácido clorídrico até atingir pH 2-3.

Todas as amostras biológicas devem ser consideradas como potencialmente infectantes.

PROCEDIMENTO TÉCNICO

Preparo do Ácido Ascórbico 0,084M (solução de uso):

Dissolver o conteúdo (pó) de um frasco de Ácido Ascórbico em 130mL de água deionizada. Guardar em frasco âmbar, identificando com o rótulo anexo. Armazenar à temperatura de 2-8°C. Permanece estável por 1 ano após sua reconstituição.

A presença de precipitado na solução de uso não implica em deterioração da mesma. Se preciso, agitar antes de usar. Identificar 3 tubos de ensaio com **B (branco)**, **T (teste)** e **P (padrão)**.

Proceder como segue:

	B	T	P
Ácido Ascórbico 0,084M (uso)	3mL	3mL	3mL
Amostra	-	100µL	-
Solução padrão	-	-	100µL
Reagente molibdato	1mL	1mL	1mL

As proteínas se precipitam. Deixar repousar durante 1 minuto.

Solução alcalina	0,5mL	0,5mL	0,5mL
-------------------------	-------	-------	-------

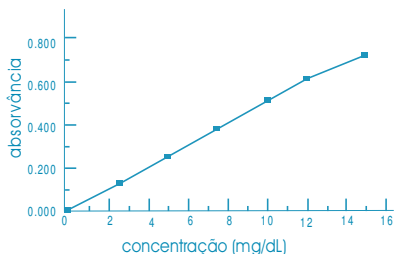
Agitar e deixar repousar por 2 minutos. Ler as absorvâncias do **T (teste)** e **P (padrão)**, ajustando o zero com o **B (branco)**, em espectrofotômetro ou fotocolorímetro, em **660nm** ou **filtro vermelho**. A cor final permanece estável por 15 minutos.

URINA

1. Coletar urina de 24 horas.
2. Acidificar uma amostra de urina com ácido clorídrico até atingir pH 2-3.
3. Diluir a urina 1:20 e proceder de maneira idêntica ao soro, multiplicando o resultado encontrado pelo fator de diluição.



CURVA DE CALIBRAÇÃO



Padrão	Absorvância	Conc. (mg/dL)
1	0,000	0
2	0,132	2,5
3	0,260	5
4	0,393	7,5
5	0,512	10
6	0,615	12
7	0,720	15

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 660nm 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. As curvas de calibração são utilizadas para substituir os cálculos matemáticos na determinação das concentrações das amostras. A leitura da amostra é localizada no gráfico apropriado e a concentração correspondente, determinada a partir da curva. Tal procedimento, contudo, só é válido se a leitura da amostra estiver no intervalo da linearidade da reação.
- A reação é linear até 12mg/dL (ver curva acima). Obtendo-se valores mais elevados, dilui-se a amostra com solução fisiológica e procede-se à nova dosagem. Multiplicar o valor encontrado pelo fator de diluição.**
- O kit de Fosfato 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 deve ser refeito periodicamente e a cada lote do produto.**
- Os padrões utilizados na montagem da curva foram ajustados tendo como referência: "Calibrador Roche, lote T 1237A", trabalhando-se com o Sistema Cobas Mira plus.

CÁLCULOS

$$\text{Fosfato (mg/dL)} = \frac{\text{absorvância teste}}{\text{absorvância padrão}} \times 5$$

Exemplo:

Leitura:

(T) = 0,255

(P) = 0,260

$$\text{Fosfato (mg/dL)} = \frac{0,255}{0,260} \times 5 = 4,9$$

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

$$\text{Fator (F)} = \frac{5}{\text{absorvância P}}$$

$$\text{Fosfato (mg/dL)} = \text{absorvância teste} \times F$$

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

Exemplo:

Leituras:

Padrão : 0,260; 0,259; 0,261

Teste : 0,255

$$\text{Média aritmética} = \frac{0,260 + 0,259 + 0,261}{3} = 0,260$$

$$\text{Fator (F)} = \frac{5}{0,260} = 19,2$$

$$\text{Fosfato (mg/dL)} = 0,255 \times 19,2 = 4,9$$

URINA

$$\text{Fosfato/urina 24hs} = \text{fosfato (mg/dL)} \times \frac{\text{vol. urinário 24 hs (mL)}}{100}$$

Exemplo:

(F) = 19,2

Vol. urinário 24 hs = 1.500mL

Diluição da amostra = 1:20

Leitura:

Teste = 0,105

$$\text{Fosfato (mg/dL)} = \text{absorvância teste} \times F \times 20 =$$

$$\text{Fosfato (mg/dL)} = 0,105 \times 19,2 \times 20 = 40,3$$

$$\text{Fosfato/urina 24 hs} = 40,3 \times \frac{1500}{100} = 604,5 \text{mg fosfato/urina 24hs}$$

EXPRESSÃO DOS RESULTADOS EM UNIDADES S.I.

$$\text{Fosfato (mmol/L)} = \text{fosfato (mg/dL)} \times 0,323$$

$$\text{Exemplo: Fosfato } 4,0 \text{mg/dL} = 0,323 \times 4,0 = 1,29 \text{mmol/L}$$

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 resultados errôneos.
- Laxativos contendo Fosfato de Sódio podem aumentar os níveis de fosfato sérico.
- Algumas drogas, como manitol e vitamina D em excesso, podem elevar os níveis de fosfato.
- Amostra hemolisada, vidraria com resíduo de detergente, hiperbilirrubinemia ou desproteinemia podem ser causa de valores falsamente elevados de fósforo.

CONTROLE DE 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.
- 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, aminas e agentes oxidantes, que deterioram os reagentes.
- As pipetagens devem ser precisas.
- Usar somente água deionizada para dosagem de íons.
- 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**).



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

Recém-nascidos	3,5 - 8,6mg/dL
Crianças	3,0 - 7,0mg/dL
Adultos	2,5 - 4,5mg/dL

Urina 350 - 1000mg fósforo/urina 24 hs

A excreção de fósforo na urina está diretamente relacionada com a ingestão de fosfatos.

SIGNIFICADO CLÍNICO

A causa mais frequente de hiperfosfatemia é a insuficiência renal. Outras condições incluem: hipoparatiroidismo, hipervitaminose D, fraturas ósseas em consolidação, lesão muscular grave, aumento da ingestão de fosfato durante terapia com laxativos contendo fosfatos.

A hipofosfatemia está presente nas deficiências de vitamina D, hiperparatiroidismo, síndrome de Fanconi, hiperinsulinismo e alcoolismo crônico.

CARACTERÍSTICAS DO SISTEMA

Foram realizados 44 testes em amostras cujos teores de Fosfato situavam-se no intervalo de 1,6 a 6,8mg/dL. Esses ensaios foram realizados em paralelo com uma metodologia de referência. A comparação do kit Fosfato Doles (Y) com a metodologia acima mencionada (X) deu origem à seguinte equação de regressão linear: $Y = 0,14 + 1,007X$, sendo o coeficiente de correlação 0,99.

Testes de recuperação, realizados com adição de quantidades conhecidas de fosfatos em 8 amostras de soros com teores diversos de fosfato, mostraram recuperação média entre 97,5 a 102,5%.

O erro da média foi de 1,26%.

Repetitividade: foram realizadas 20 dosagens sucessivas, com 2 amostras, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2
Concentração (mg/dL)	2,56	4,83
Desvio padrão (mg/dL)	0,04	0,06
Coefficiente de variação (%)	1,63	1,30

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

	Amostra 1	Amostra 2
Concentração (mg/dL)	2,24	4,28
Desvio padrão (mg/dL)	0,07	0,13
Coefficiente de variação (%)	3,07	2,97

Especificidade: o fosfato presente no sangue existe como fosfato livre (fosfato inorgânico) ou em combinação com um grupo orgânico (fosfato orgânico). Esse último encontra-se especialmente nos eritrócitos. Estudos com a presente metodologia (Gomori modificado) demonstram que a técnica é específica para determinação do fosfato inorgânico, quando utilizada em amostras isentas de hemólise. A precipitação das proteínas permite que o reagente de molibdato em meio ácido reaja somente com o fosfato inorgânico, formando um complexo fosfomolibdato, que é posteriormente reduzido em meio alcalino pelo ácido ascórbico.

Sensibilidade: a absorvância encontrada, de 0,013, corresponde a 0,25mg/dL de concentração de fosfato inorgânico, quando realizados os testes em espectrofotômetro, a 660nm. 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 *Gomori modificado*.

Substâncias interferentes: amostra hemolizada, vidraria com resíduo de detergente, hiperbilirrubinemia ou desproteïnemia podem causar valores elevados de fósforo. Certas drogas podem alterar os níveis de fósforo inorgânico. Para controle de tal interferência, é recomendado que o paciente seja questionado quanto ao uso de medicamentos.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Fiske, C.H. e Subbaruw, Y.: *Biol. chem.* 66:375, 1925.
- Gomori, G. J.: *Lab. clin. med.* 27:955, 1942.
- Baginski, E.S.: *Am. J. med. tech.* 35:475, 1969.
- 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 1051
e-mail: doles@doles.com.br

M.S.: nº 10231810026

Revisão: 10 (09/2009)

NBR ISO 9001

**Sistema da Qualidade
certificado desde 1999**

