

Finalidade . Sistema para a determinação do Fósforo Inorgânico em amostras de sangue, urina e líquido amniótico com reação de ponto final.

Uso profissional

[Somente para uso diagnóstico in vitro.]

Princípio . Os íons fosfato reagem com o molibdênio em meio ácido formando um complexo amarelo, o qual, por ação de um tampão alcalino, é reduzido a azul-molibdênio que é medido colorimetricamente.

Características do sistema . A Labtest desenvolveu um método rápido e simples para determinação direta do fósforo inorgânico. A introdução de um potente catalisador promove a rápida realização da dosagem. O redutor foi substituído pela hidroxilamina que não tem os inconvenientes de instabilidade dos outros redutores como o metol, ácido ascórbico e ANSA.

A interferência das proteínas é inibida pela solubilização em meio alcalino, que também acelera o desenvolvimento da cor.

O método proposto utiliza a técnica manual e é facilmente aplicável à maioria dos analisadores semiautomáticos e automáticos capazes de pipetar dois reagentes e medir com exatidão uma reação de ponto final entre 640 e 700 nm.

Metodologia . Fósforo Molibdato.

Reagentes

1. [R1] - Catalisador - Armazenar entre 15 - 25 °C.

Contém polivinilpirrolidona e cloridrato de hidroxilamina 2,88 mol/L. Este reagente pode apresentar coloração de levemente amarelada a alaranjada.

2. [R2] - Reagente Molibdato - Armazenar entre 15 - 25 °C.

Contém molibdato de amônio 41 mmol/L e ácido sulfúrico 900 mmol/L.

3. [R3] - Tampão - Armazenar entre 15 - 25 °C.

Contém carbonato de sódio 50 mmol/L e hidróxido de sódio 10 mol/L.

4. [CAL] - Padrão 5,0 mg/dL - Armazenar entre 15 - 25 °C.

Após o manuseio sugere-se armazenar bem vedado, entre 2 - 8 °C, para evitar evaporação.

Os reagentes não abertos, quando armazenados nas condições indicadas, são estáveis até a data de expiração impressa no rótulo. Durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos a contaminações de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

Precauções e cuidados especiais

Os cuidados habituais de segurança devem ser aplicados na manipulação de reagentes. O Reagente Molibdato e o Tampão são cáusticos e podem produzir queimaduras. Deve-se tomar cuidado para evitar a ingestão e no caso de contato com a pele e os olhos, deve-se lavar imediatamente com grande quantidade de água e procurar auxílio médico.

O uso de detergente iônico para limpar o material é uma fonte de contaminação com íons de fósforo.

Ao usar os reagentes nº 1, 2 e 3, pingar as gotas diretamente na água destilada e não pela parede do tubo de ensaio. Usar o conta gotas exatamente na posição vertical.

É importante não trocar as tampas dos reagentes.

Os reagentes não abertos, quando armazenados nas condições indicadas, são estáveis até a data de expiração impressa no rótulo. Durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos a contaminações de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

Material necessário e não fornecido

1. Fotômetro capaz de medir, com exatidão, a absorbância entre 640 e 700 nm.
2. Pipetas para medir amostras e reagente.
3. Cronômetro.

Influências pré-analíticas . Para controle terapêutico, é aconselhável colher a amostra sempre no mesmo horário, devido a variações circadianas do fósforo.

Encontram-se valores significativamente mais baixos durante o período menstrual e em pessoas obesas.

Amostra

Deve ser criado um Procedimento Operacional Padrão (POP) que estabeleça procedimentos adequados para coleta, preparação e armazenamento da amostra. Enfatizamos que os erros devidos à amostra podem ser muito maiores que os erros ocorridos durante o procedimento analítico.

Usar soro ou plasma (heparina), urina e líquido amniótico. O soro ou plasma devem ser separados até uma hora após a coleta para minimizar a liberação do fósforo das hemácias. O analito é estável por 2 dias entre 15 - 25 °C e por uma semana entre 2 - 8 °C.

Plasmas citratados, oxalátados, fluoretados ou com EDTA, fornecem resultados falsamente diminuídos.

Como nenhum teste conhecido pode assegurar que amostras de sangue não transmitem infecções, todas elas devem ser consideradas como potencialmente infectantes. Portanto, ao manuseá-las devem-se seguir as normas estabelecidas para biossegurança.

Para descartar os reagentes e o material biológico, sugerimos aplicar as normas locais, estaduais ou federais de proteção ambiental.

Interferências

Valores de Bilirrubina até 5 mg/dL e Triglicérides até 170 mg/dL não produzem interferências significativas.

Valores de Bilirrubina entre 5 e 38 mg/dL produzem resultados falsamente elevados.

Valores de Triglicérides entre 170 e 3500 mg/dL produzem resultados falsamente elevados por interferência fotométrica. A ação deste interferente pode ser minimizada com o uso do branco da amostra, que é aplicável para valores de Triglicérides até 900 mg/dL.

Amostras hemolisadas produzem resultados falsamente elevados, devido à contaminação do plasma ou soro com o fósforo das hemácias. Esta interferência não é corrigida utilizando o branco da amostra.

Para avaliar a concentração aproximada da hemoglobina em uma amostra hemolisada pode-se proceder do seguinte modo: Diluir 0,05 mL da amostra em 2,0 mL de NaCl 150 mmol/L (0,85%) e medir a absorbância em 405 ou 415 nm acertando o zero com água deionizada ou destilada.

$$\text{Hemoglobina (mg/dL)} \cong \text{Absorbância}_{405} \times 601$$

$$\text{Hemoglobina (mg/dL)} \cong \text{Absorbância}_{415} \times 467$$

Minimização da ação de interferentes . Branco da Amostra: Misturar 2,5 mL de NaCl 150 mmol/L (0,85%) com 0,1 mL da amostra. Medir a absorbância em 650 nm, acertando o zero com água destilada ou deionizada. Subtrair a absorbância assim obtida, da absorbância do teste e calcular a concentração. Este sistema de correção é aplicável apenas nos casos em que a amostra produz interferência fotométrica.

Procedimento

Ver observações 1 e 2.

Para a dosagem na urina, homogeneizar bem a amostra, separar 10 mL, e acertar pH entre 1 e 3 com HCl concentrado para dissolver os cristais de fosfato. Diluir a urina 1:10 (0,1 mL de urina + 0,9 mL de água destilada ou deionizada). Multiplicar o resultado obtido por 10.

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Água destilada ou deionizada	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
Amostra	----	0,1 mL	----
Padrão (nº 4)	----	----	0,1 mL
Catalisador (Nº 1)	1 gota	1 gota	1 gota

Misturar.

Reagente Molibdato (nº 2)	1 gota	1 gota	1 gota
---------------------------	--------	--------	--------

Agitar fortemente (nesta fase ocorre turvação). Colocar em banho de água fria (20 - 25 °C) durante 3 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio.

Tampão (nº 3)	2 gotas	2 gotas	2 gotas
---------------	---------	---------	---------

Agitar fortemente e colocar em banho de água fria (20 - 25 °C) durante 5 minutos. Determinar as absorbâncias do teste e padrão em 650 nm ou filtro vermelho (640 a 700), acertando o zero com o branco. A cor é estável por 15 minutos.

O branco é incolor. A presença de cor azulada visível no branco ocorre quando se usa água de qualidade inadequada.

A água deve ter uma resistividade ≥ 1 megaohm.cm ou uma condutividade ≤ 1 microsiemens/cm e concentração de silicatos $< 0,1$ mg/L.

O procedimento sugerido para a medição é adequado para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 2,5 mL. Deve ser feita uma verificação da necessidade de ajuste do volume para o fotômetro utilizado. Os volumes de amostra e reagente podem ser modificados proporcionalmente sem prejuízo para o desempenho do teste e o procedimento de cálculos se mantém inalterado. Em caso de redução dos volumes, é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a leitura fotométrica.

Cálculos

$$\text{Fósforo (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 5$$

Exemplo

$$\begin{aligned} \text{Absorbância do teste} &= 0,216 \\ \text{Absorbância do padrão} &= 0,325 \end{aligned}$$

$$\text{Fósforo (mg/dL)} = \frac{0,216}{0,325} \times 5 = 3,3$$

Devido a grande reprodutibilidade que pode ser obtida com a metodologia, pode-se utilizar o método do fator.

$$\text{Fator de Calibração} = \frac{5}{\text{Absorbância do padrão}}$$

$$\text{Fósforo (mg/dL)} = \text{Absorbância do teste} \times \text{Fator}$$

$$\text{Urina (mg/24 horas)} = \frac{\text{mg/dL} \times \text{volume de 24 horas (em mL)}}{100}$$

Exemplo

$$\text{Fator} = \frac{5}{0,325} = 15,38$$

$$\text{Fósforo (mg/dL)} = 0,216 \times 15,38 = 3,3$$

Calibração . O padrão é rastreável ao Standard Reference Material (SRM) 186 I-f do National Institute of Standards and Technology (NIST).

Calibrações manuais

Obter o fator de calibração ao usar novo lote de reagentes ou quando o controle interno da qualidade indicar.

Sistemas automáticos

Branco de reagentes: água ou solução de cloreto de sódio 150 mmol/L (0,85%);

Padrões: usar calibradores protéicos. As concentrações de fósforo nos calibradores da linha Calibra Labtest são rastreáveis ao SRM 186 I-f do NIST.

Intervalo de calibrações:

Calibração de 2 ou 3 pontos ao mudar de lote;

Calibração de 2 ou 3 pontos quando o controle interno da qualidade indicar.

Linearidade

O resultado da medição é linear até 14 mg/dL. Quando for obtido um valor igual ou maior que 14 mg/dL, diluir a amostra com NaCl 150 mmol/L (0,85%), realizar nova medição e multiplicar o resultado pelo fator de diluição.

Controle interno da qualidade . O laboratório deve manter um programa de controle interno da qualidade que defina claramente os regulamentos aplicáveis, objetivos, procedimentos, critérios para especificações da qualidade e limites de tolerância, ações corretivas e registro das atividades. Materiais de controle devem ser utilizados para avaliar a imprecisão e desvios da calibração.

Sugere-se que as especificações para o coeficiente de variação e o erro total sejam baseadas nos componentes da variação biológica (VB)^{7,8}.

Fosfolípides . Em um tubo de centrifugador pipetar 2,7 mL de álcool isopropílico e adicionar 0,3 mL de soro gota a gota. Misturar bem e esperar 5 minutos. Centrifugar por 3 minutos.

Tomar 1,0 mL de sobrenadante límpido, colocar em tubo de ensaio e evaporar em banho fervente até secagem completa.

Aquecer em chama até haver clareamento total da mistura (5 minutos). Deixar esfriar.

Dosar o fósforo de acordo com o procedimento técnico, omitindo a etapa de colocação da amostra (0,1 mL).

$$\text{Fosfolípides (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 125$$

Intervalo de Referência⁹ . Os intervalos devem ser usados apenas como orientação. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça, na população atendida, seus próprios intervalos de referência.

Soro (mg/dL)

Crianças	4,0 a 7,0
Adultos	2,5 a 4,5

Urina: 400 a 1300 mg/24 horas

A excreção de fosfato urinário varia com a idade, massa muscular, dieta, função renal, concentração de paratormônio e hora do dia.

Fosfolípides (em lecitina) . 125 a 300 mg/dL

Conversão . Unidades Convencionais (mg/dL) x 0,323 = Unidades SI (mmol/L).

Características do desempenho¹⁰

Exatidão . Em duas amostras com concentrações de fósforo iguais a 1,6 e 2,6 mg/dL foram adicionadas quantidades diferentes do analito, obtendo-se recuperações entre 97 e 101%. O erro Sistemático proporcional médio obtido em um valor de 2,5 mg/dL, foi igual a 0,025 mg/dL ou 1,0%.

Especificidade . O método proposto foi comparado com um método Molibdato UV, utilizando 80 amostras com valores situados entre 2,1 e 10,5 mg/dL. A comparação resultou na equação da regressão: $y = 0,433 + 0,935x$ e um coeficiente de correlação (r) igual a 0,995. O erro sistemático total (constante e proporcional) verificado no nível de decisão (2,5 mg/dL), foi igual a 0,27 mg/dL ou 10%. Como as amostras foram selecionadas aleatoriamente em pacientes de ambulatório e pacientes hospitalizados, pode-se inferir que o método tem uma especificidade metodológica adequada.

Repetitividade - imprecisão intraensaio

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	20	1,8	0,02	1,2
Amostra 2	20	2,5	0,02	0,8
Amostra 3	20	4,8	0,03	0,5

Reprodutibilidade - imprecisão total

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	20	1,8	0,03	1,8
Amostra 2	20	2,5	0,06	2,5
Amostra 3	20	4,7	0,18	3,9

Sensibilidade metodológica . Uma amostra protéica não contendo fósforo foi utilizada para calcular o limite de detecção do ensaio, tendo sido encontrado um valor igual a 0,13 mg/dL, equivalente à média de 20 ensaios mais dois desvios padrão. Utilizando-se a absorbância do padrão como parâmetro, o limite de detecção fotométrica é 0,015 mg/dL, correspondendo a uma absorbância igual a 0,001.

Efeitos da diluição da matriz . Duas amostras com valores iguais a 12,8 e 15,4 mg/dL, foram utilizadas para avaliar a resposta do sistema nas diluições da matriz com NaCl 150 mmol/L (0,85%). Usando fatores de diluição que variaram de 2 a 8, encontrou-se recuperações entre 98 e 105%.

Significado clínico . Embora a insuficiência renal crônica e o hipoparatiroidismo sejam as duas causas mais comuns de hiperfosfatemia várias condições podem causar hiperfosfatemia transitória e assintomática.

Como o músculo se constitui no grande reservatório de fosfato é evidente que a rhabdomiólise produz severa hiperfosfatemia.

Outras condições que promovem a liberação do fosfato intracelular e levam à hiperfosfatemia incluem a hipertermia maligna e a quimioterapia antibiástica.

A hiperfosfatemia pode ocorrer após administração de laxativos e enemas de retenção que contém fosfato. Repetidos enemas contendo fosfato podem produzir hiperfosfatemia.

Níveis diminuídos de fósforo são encontrados no hiperparatiroidismo, na intoxicação pelo chumbo e na alimentação parenteral.

Observa-se discreta redução do fósforo sérico no último trimestre de gravidez.

Observações

1. A limpeza e secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.

2. O laboratório clínico tem como objetivo fornecer resultados exatos e precisos. A utilização de água de qualidade inadequada é uma causa potencial de erros analíticos. A água deionizada ou destilada utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes, usar nas medições e para uso no enxágue final da vidraria, deve ter resistividade ≥ 1 megaohm.cm ou condutividade ≤ 1 microsiemens/cm e concentração de silicatos $< 0,1$ mg/L. Quando a coluna deionizadora está com sua capacidade saturada ocorre produção de água alcalina com liberação de vários íons, silicatos e substâncias com grande poder de oxidação ou redução que deterioram os reagentes em poucos dias ou mesmo horas, alterando os resultados de modo imprevisível. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle da qualidade da água.

3. Para uma revisão das fontes fisiopatológicas e medicamentosas de interferência nos resultados e na metodologia sugere-se consultar www.fxol.org.

Referências

1. Baginsk ES. Am J Med Tech 1969;35:475.
2. Fiske CH, Subarrow Y. J Biol Chem 1925;66:375.
3. Gomori G. J Lab Clin Med 1942;27:955.

4. Tonks DB. Quality Control in Clinical Laboratories, Warner-Chilcott Laboratories, Diagnostic Reagents Division, Scarborough, Canada, 1972.

5. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, Burtis CA, Ashwood ER eds, 2ª edição, The W.B. Saunders Co, Philadelphia, 1994

6. Westgard JO, Barry PL, Hunt MR. Clin Chem 1981;27:493-501.

7. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Base de Datos de Variación Biológica. Disponível em: <http://www.seqc.es/article/articleview/330/1/170> (acesso em 04/2006).

8. Basques JC. Especificações da Qualidade Analítica. Labtest Diagnóstica 2005.

9. Burtis CA, Ashwood ER. Textbook of Clinical Chemistry, 4ª. Edição, Philadelphia: W.B. Saunders, 2006: 2251-2318.

10. Labtest: Dados de Arquivo.

Apresentação

Produto	Referência	Conteúdo
Fósforo	42-100	R11 1 X 6 mL
		R12 1 X 6 mL
		R13 1 X 12 mL
		CAL 1 X 5 mL

Estão disponíveis aplicações para sistemas automáticos.

Informações ao consumidor

[Termos e Condições de Garantia]

A Labtest Diagnóstica garante o desempenho deste produto dentro das especificações até a data de expiração indicada nos rótulos desde que os cuidados de utilização e armazenamento indicados nos rótulos e nestas instruções sejam seguidos corretamente.

Labtest Diagnóstica S.A.

CNPJ: 16.516.296 / 0001 - 38
Av. Paulo Ferreira da Costa, 600 - Vista Alegre - CEP 33400-000
Lagoa Santa - Minas Gerais Brasil - www.labtest.com.br

Serviço de Apoio ao Cliente | 0800 031 34 11 (Ligação Gratuita)
e-mail: sac@labtest.com.br

Revisão: Agosto, 2013
Ref.: 100517

Copyright by Labtest Diagnóstica S.A.
Reprodução sob prévia autorização

Símbolos utilizados com produtos diagnósticos in vitro

Símbolos usados con productos diagnósticos in vitro

Symbols used with ivd devices

	Conteúdo suficiente para < n > testes Contenido suficiente para < n > tests Contains sufficient for < n > tests		Risco biológico Riesgo biológico Biological risk
	Data limite de utilização (aaaa-mm-dd ou mm/aaaa) Estable hasta (aaaa-mm-dd o mm/aaaa) Use by (yyyy-mm-dd or mm/yyyy)		Marca CE Marcado CE CE Mark
	Material Calibrador Material Calibrador Calibrator Material		Tóxico Tóxico Poison
	Material Calibrador Material Calibrador Calibrator Material		Reagente Reactivo Reagent
	Limite de temperatura (conservar a) Temperatura limite (conservar a) Temperature limitation (store at)		Fabricado por Elaborado por Manufactured by
	Representante Autorizado na Comunidade Europeia Representante autorizado en la Comunidad Europea Authorized Representative in the European Community		Número do lote Denominación de lote Batch code
	Consultar instruções de uso Consultar instrucciones de uso Consult instructions for use		Controle Control Control
	Número do catálogo Número de catálogo Catalog Number		Controle negativo Control negativo Negative control
	Adições ou alterações significativas Cambios o suplementos significativos Significant additions or changes		Controle positivo Control positivo Positive control
	Produto diagnóstico in vitro Dispositivo de diagnóstico in vitro In vitro diagnostic device		Controle Control Control
	Liofilizado Liofilizado Lyophilized		Corrosivo Corrosivo Corrosive
	Período após abertura Período post-abertura Period after-opening		Uso veterinário Uso veterinario Veterinary use
	Instalar até Instalar hasta Install before		

Ref.: 140214 |