

## EBRAM PRODUTOS LABORATORIAIS LTDA.

Rua Julio de Castilhos, 500 - Belenzinho  
São Paulo - SP - Tel.: +55 11 2291 2811  
CEP 03059-001 | Indústria Brasileira  
CNPJ.: 50.657.402/0001-31

### RESPONSÁVEL TÉCNICA

Nadjara Novaes Longen | CRF-SP - 37.451

Para mais informações, entrar em contato com o **SAC EBRAM**  
11 2291 2811 ou [sac@ebtram.com](mailto:sac@ebtram.com)  
[www.ebtram.com](http://www.ebtram.com)



## QUIMIFAL - Fosfatase Alcalina

### p-Nitrofenilfosfato

REG. MS: 10159820163

Revisão: julho/2020

**FINALIDADE.** Reação enzimática para determinação quantitativa de fosfatase alcalina em amostra de soro ou plasma humanos. Somente para uso diagnóstico "in vitro."

**PRINCÍPIO.** O reagente é baseado na adaptação por Wilkinson et al no método de Bessey, Lowry e Brock usando p-nitrofenilfosfato como substrato.

A fosfatase alcalina catalisa a hidrólise do p-nitrofenilfosfato (Npp) a p-nitrofenol + fosfato. O aumento da absorvância a 405 nm é proporcional à atividade de fosfatase alcalina presente na amostra.



**METODOLOGIA.** p-Nitrofenilfosfato (IFCC)

**SIGNIFICADO CLÍNICO.** A fosfatase alcalina (FAL) está amplamente distribuída nos tecidos humanos, notadamente na mucosa intestinal, fígado (canalículos biliares), túbulos renais, baço, ossos (osteoblastos), leucócitos e placenta.

A forma predominante no soro em adultos normais origina-se, principalmente, no fígado e esqueleto. Apesar da exata função metabólica da enzima ser desconhecida, parece estar associada com o transporte lipídico no intestino e com processos de calcificação óssea.

No fígado, a FAL está localizada na membrana celular que une a borda sinusoidal das células parenquimais aos canalículos biliares. Nos ossos a atividade da FAL está confinada aos osteoblastos onde ocorre a formação óssea.

As elevações de FAL ocorrem em:

Lesões expansivas - carcinoma hepatocelular primário, metástases, abscessos e granuloma; hepatite viral e cirrose; obstrução extra-hepática das vias biliares; doenças ósseas e na gravidez, onde a FAL sofre aumento de 2-3 vezes, são observados no terceiro trimestre, aumentos ou reduções inexplicáveis da FAL predizem complicações na gravidez, tais como pré-eclâmpsia e eclâmpsia. Outras desordens para hiperfosfatemia são: Mononucleose infecciosa, colangite, cirrose biliar primária, pancreatite aguda e crônica, neoplasias, hipertireoidismo, infarto, septicemia extra-hepática, infecções bacterianas intra-abdominais, síndrome de Fanconi, tireotoxicose e hiperfosfatemia transiente benigna em crianças.

### REAGENTES.

**Reagente 1:** Pronto para uso. Conservar entre 2 - 8 °C. Contém: 2-Amino-2metil-1propanol a 0.35mM, Sulfato de Magnésio a 2.0mM, Sulfato de Zinco a 1.0mM e EDTA a 2.0mM.

**Reagente 2:** Pronto para uso. Conservar entre 2 - 8 °C. Mantê-lo ao abrigo da luz. Contém: p-Nitrofenilfosfato a 16.0mM; pH 10,1±0.1.

Os reagentes não abertos são estáveis até a data de vencimento impressa no rótulo do produto e on board (em um compartimento refrigerado do analisador) possuem estabilidade de aproximadamente 7 dias. Durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos a contaminação de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

### REAGENTE DE TRABALHO

Para alguns analisadores é necessário preparar o Reagente de Trabalho (verifique o protocolo do analisador): Preparar 4 partes do reagente 1 para 1 parte do reagente 2. Ex.: 4mL de R1 + 1mL de R2. O reagente após o preparo é estável por 2 meses quando armazenado a 2 - 8°C ao abrigo da luz.

### PRECAUÇÕES E CUIDADOS REQUERIDOS.

Este reagente deve ser usado somente para diagnóstico "in vitro". Não pipetar com a boca. Evitar contato com a pele e roupa. No caso de contato com os olhos, lavar com grande quantidade de água e procurar auxílio médico.

O reagente contém azida sódica como conservante (0,01%). Este componente pode reagir com cobre e chumbo podendo tornar-se um metal explosivo. Ao descartá-lo, adicionar grande quantidade de água. Não congelar os reagentes.

Deve-se monitorar a temperatura do ambiente de trabalho bem como o tempo de reação para obtenção de resultados corretos. Não usar se a absorvância do branco ultrapassar 1,200 quando medido a 405

nm (cuveta de 1cm), se houver dificuldade em conseguir os valores estabelecidos para o soro controle fresco ou se houver turbidez o que indica deteriorização do reagente.

### MATERIAL NECESSÁRIO NÃO FORNECIDO.

1. Banho-maria ou analisador capaz de manter uma temperatura de 37°C e capaz de medir absorvância de 405 nm.
2. Pipetas para medição de amostras e reagente.
3. Água destilada/deionizada para o equipamento.
4. Consumíveis do analisador quando usado.
5. Calibrador e Soros Controle.
6. Medidor de tempo.

**AMOSTRA.** Soro ou plasma (colhido com heparina). A fosfatase alcalina é estável por 7 dias se mantido entre 2-8°C.

Todas as amostras são consideradas potencialmente infectantes, portanto sugerimos manuseá-las seguindo as normas estabelecidas de Biossegurança.

**PREPARO DO PACIENTE.** É recomendado um jejum de 4 horas. Lactentes: antes da próxima mama. Ainda, poderá ser modificado segundo orientação médica.

### INTERFERÊNCIAS.

Amostras hemolisadas não devem ser usadas. Hemoglobina até 2,5 g/L, Bilirrubina até 20 mg/dL e Triglicérides até 10 g/L não interferem significativamente no resultado.

Algumas drogas e substâncias afetam a concentração da fosfatase alcalina, sugerimos consultar Young et al.

### PARÂMETROS DO SISTEMA:

Temperatura	37°C
Comprimento de Onda	405nm
Tipo de Reação	Cinética
Direção	Crescente
Vol. Amostra	20µL
Vol. Reagente 1	800µL
Vol. Reagente 2	200µL
Tempo de Incubação	1 minuto (retardo)
Intervalo de leitura	1 minuto
Número de intervalos	2 a 3

**CALIBRAÇÃO.** Utilizar Quimicalib Ebram cód.7023/12023 que possui a concentração rastreável ao método de referência proposto pelo CLSI, ou realizar a calibração através de fatoração, obtida através da absorção média milimolar do p-Nitrofenol a 405 nm sobre condições específicas.

**PROCEDIMENTO AUTOMATIZADO.** Aplicação no sistema automatizado: vide manual para utilização do equipamento e instruções de uso do reagente.

Aplicação no sistema semi-automático: proceder como demonstrado a seguir no procedimento manual somente até o item 2 (preparação dos tubos), em seguida utilizar o equipamento para leitura, seguindo protocolo analítico específico baseado no item Parâmetros do Sistema.

Nota: Adicionar as amostras no tubo somente no momento que antecede a aspiração do equipamento.

### PROCEDIMENTO MANUAL.

1. Preparar o Reagente de Trabalho: Misturar os reagentes na proporção: 1 parte do Reagente 2 + 4 partes do Reagente 1 (4mL R1 + 1mL R2).

2. Separar 3 tubos de ensaio e realizar os procedimentos conforme abaixo:

	1. Branco	2. Calib	3. Amostra/S.C.
Água destilada	20 µL	-	-
Calibrador	-	20 µL	-
Amostra/S.C.	-	-	20 µL
Reagente de trabalho	1,00 mL	1,00 mL	1,00 mL

- Adicionar 1,00 mL do reagente de trabalho em dois tubos e deixe em banho maria (BM) a 37°C. O nível de água no BM deve ser superior ao nível de reagentes nos tubos de ensaio.
- Adicionar 20µL do calibrador e 20µL de água destilada em cada tubo.
- Aguardar 3 minutos
- Zerar o espectrofotômetro a 405nm com o tubo do branco.
- Inserir no equipamento o tubo com o calibrador e registrar as absorvâncias A1, A2, A3, considerando A1 a primeira leitura (logo após o 1º minuto de retardo) e as seguintes com 1 minuto de intervalo.
- Determinar as duas diferenças de absorvância/min (Δ Abs/min), subtraindo cada leitura de sua anterior.
- Determinar a média das diferenças de absorvância (Δ Abs/min). Proceder em seguida do mesmo modo com os controles e todas as amostras.

Obs.: Procedimento sugerido para espectrofotômetros que requerem volume mínimo de 1,0 mL e podem ser ajustados proporcionalmente sem influência no desempenho do teste. Salientamos que volumes de amostra menores do que 10 µL aumentam a imprecisão da medição em aplicações manuais.

**CÁLCULOS.** A concentração de lactato na amostra é calculada a partir da seguinte fórmula geral:

(Abs.=Absorvância)  
(Conc. = Concentração)

$$\Delta \text{Abs./min} = (A2 - A1) + (A3 - A2) / 2$$

$$\text{FAL da amostra (U/L)} = \frac{\Delta \text{Abs./min (amostra)}}{\Delta \text{Abs./min (Calib)}} \times \text{Conc. do Calib (U/L)}$$

#### EXEMPLO:

Absorvancia com o Calibrador  
A1 = 0,028 / A2 = 0,060 / A3 = 0,104

$$\text{Média } \Delta \text{Abs./min} = \frac{(0,060 - 0,028) + (0,104 - 0,060)}{2}$$

Média Δ Abs/min = 0,038

Média Δ Abs/min (amostra) = 0,034 (calc. l dem acima)

Concentração do Calibrador = 443 U/L

FAL Amostra = (0,008 / 0,038) 443

FAL Amostra= 93 U/L

Obs: nkat/L= U/L x 16,67

**LINEARIDADE.** Quando executado de acordo com o recomendado, o teste é linear até 1200 U/L. Amostras com valores superiores a 1200 U/L devem ser diluídas com solução salina a ponto de ficarem entre 1 - 1200 U/L e os resultados devem ser multiplicados pelo fator de diluição.

**CONTROLE DE QUALIDADE.** Cada laboratório deve manter um programa interno de qualidade que defina objetivos, procedimentos, normas, limites de tolerância e ações corretivas. Deve-se manter também um sistema definido para se monitorar a variação analítica do sistema de medição. Aconselhamos o uso dos soros controle Quimicontrol Normal e Quimicontrol Anormal Ebram Cód. 7024 / 12024 e 7031 / 12031.

#### VALORES ESPERADOS.

Os seguintes valores são baseados nas medições desempenhadas a 37°C.

	Homens	Mulheres
1-9 anos	<350 U/L	<350 U/L
10-14 anos	<275 U/L	<280 U/L
15-19 anos	<155 U/L	<150 U/L
20-50 anos	53 - 128 U/L	42 - 98 U/L
> 60 anos	56 - 119 U/L	53 - 141 U/L

Estes valores são dados unicamente como título orientativo. É recomendado que cada laboratório estabeleça seu próprio intervalo de referência.

**ESTUDOS COMPARATIVOS.** Estudos executados entre este procedimento e uma metodologia similar produziram os seguintes resultados:

Número de amostras	49
Intervalo dos resultados	9-1501 (U/L)
Coefficiente de correlação	0.9992
Inclinação	0.962
Intercepta	2.9 (U/L)

**PRECISÃO.** Estudos de precisão foram executados com dois níveis (normal e patológico) sendo que cada amostra fora processada por 10 vezes e os seguintes dados estatísticos foram encontrados:

N=40	Nível 1	Nível 2	Nível 3
Média (U/L)	30.6	66.7	197.8
D.P. (U/L)	0.07	0.8	1.7
C.V. (%)	2.2	1.2	0.9

**EXATIDÃO.** As amostras foram processadas por 10 dias consecutivos, uma vez por dia e em duplicata. Os seguintes dados estatísticos foram encontrados:

N=40	Nível 1	Nível 2	Nível 3
Média (U/L)	30.6	66.7	197.8
D.P. (U/L)	1.2	1.8	2.6
C.V. (%)	4.1	2.7	1.3

**SENSIBILIDADE METODOLÓGICA.** 1,0 U/L

**ESPECIFICIDADE.** Como as amostras foram selecionadas aleatoriamente em pacientes de ambulatório e hospitalizados, pode-se inferir que o método tem uma especificidade metodológica adequada.

#### OBSERVAÇÕES.

- A limpeza e a secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
- A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes e usar nas medições, deve ter resistividade ≥ 1 mega ohm ou condutividade ≤ 1 microsiemens e concentração de silicatos < 0,1 mg/L (água tipo II). Para o enxágüe da vidraria a água pode ser do tipo III, com resistividade ≥ 0,1 megaohms ou condutividade ≤ 10 microsiemens. No enxágüe final utilizar água tipo II.

#### APRESENTAÇÃO.

Linha Bioquímica Geral: R1= 10 x 10mL + R2= 5 x 5mL










Linha Bulk: R1= 1 x 200mL + R2= 1 x 50mL

Linha SAT: R1= 2 x 36mL + R2= 1 x 18mL

#### REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.

- Thomas L. Clinical laboratory Diagnostics. 1ª ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft; 36-46 (1998).
- Tietz, N., Textbook of Clinical Chemistry 3d ed, Philadelphia, W.B. Saunders, 1999 pp, 617-721
- Fujita, H., J. Biochem, (Japan) 30:69 (1969).
- Bessey, O. A., Lowry, OH., Brook, M.J., J. Biol. Chem. 164:321 (1964).
- Bowers, G. N., Jr., McComb, R.B., Clin. Chem. 12:70 (1966).
- Young, D.S., et al, Clin. Chem. 21:1D (1975).
- Arquivos da EBRAM.

#### SÍMBOLOS UNIVERSAIS UTILIZADOS EM EMBALAGENS DE DIAGNÓSTICO IN VITRO

 CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO	 REAGENTE	 FABRICADO POR
 O CONTEÚDO É SUFICIENTE PARA <N> TESTES	 DATA DE VALIDADE (ÚLTIMO DIA DO MÊS)	 NÚMERO DO LOTE
 LIMITE DE TEMPERATURA (CONSERVAR A)	 PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO	 NÚMERO DO CATÁLOGO