



# QUIMIFAL - Fosfatase Alcalina p-Nitrofenilfosfato

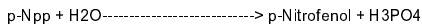
## Finalidade:

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, tirototoxicose 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 até 30 dias 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 1,00 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:

- Banho-maria ou analisador capaz de manter uma temperatura de 37°C e capaz de medir absorvância de 405 nm.
- Pipetas para medição de amostras e reagente.
- Água destilada/deionizada para o equipamento.
- Consumíveis do analisador quando usado.
- 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 mamada. Todavia, poderá ser modificado segundo orientação médica.

## Interferências:

Amostras hemolisadas não devem ser usadas. Hemoglobina até 1000mg/dL, Bilirrubina até 25.8 mg/dL, Triglicérides até 842 mg/dL 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: 405 nm  
Tipo de Reação: Cinética  
Direção: Crescente  
Vol. Amostra: 20µL  
Vol. Reagente 1: 1.0 mL  
Vol. Reagente 2: 250µL  
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:

- Preparar o Reagente de Trabalho: Misturar os reagentes na proporção: 1 parte do Reagente 2 + 4 partes do Reagente 1 (4mL R1 + 1mL R2).
- Separar 3 tubos de ensaio e realizar os procedimentos conforme abaixo:

	Branco	Calib.	Amostra/S.C.
Água destilada	20µL	-	-
Calibrador	-	20µL	-
Amostra/S.C.	-	-	20µL
Reagente de trabalho	1,25mL	1,25 mL	1,25 mL

3. Adicionar 1,25 mL do reagente de trabalho em dois tubo 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.

4. Adicionar 20µL do calibrador e 20µL de água destilada em cada tubo.

5. Aguardar de 3 minutos

6. Zerar o espectrofotômetro a 405nm com o tubo do branco.

7. Inserir no equipamento o tubo com o calibrador e registrar as absorvâncias A1, A2, A3, considerando A1 a primeira leitura (logo após os 1 minutos de retardo) e as seguintes com 1 minutos de intervalo.

8. Determinar as duas diferenças de absorvância/min (Δ Abs/min), subtraindo cada leitura de sua anterior.

9. 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:

(Abs. = Absorvância)  
(Conc. = Concentração)  
Δ Abs. /min = (A2 - A1) + (A3 - A2) / 2

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

## Exemplo:

Absorvância com o Calibrador  
A1 = 0,028 / A2 = 0,060 / A3 = 0,104  
Média Δ 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 1500 U/L. Amostras com valores superiores a 1500 U/L devem ser diluídas com solução salina a ponto de ficarem entre 2 - 1500 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 - 128U/L	42 - 98 U/L
> 60 anos:	56 - 119U/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	Nível1	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:

2.0 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 enxágue da vidraria a água pode ser do tipo III, com resistividade ≥ 0,1 megaohms ou condutividade ≤ 10 microsiemens. No enxágue 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 Hitachi 917: R1= 3 x 20mL + R2= 1 x 17mL  
Linha SAT: R1= 2 x 36mL + R2= 1 x 18mL

Para mais informações sobre sistemas automáticos, entrar em contato com o SAC EBRAM - tel. (011) 2291-2811, sac@ebram.com ou www.ebram.com

## 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, O.H., Brook, M.J., J. Biol. Chem. 164:321 (1964).
- Bowers, G. N., Jr., McCComb, R.B., Clin. Chem. 12:70 (1966).
- Young, D.S., et al. Clin. Chem. 21:1D (1975).
- Burtis CA, Aswood ER, Eds. Tietz textbook of clinical chemistry 3rd ed. Philadelphia: W. B. Saunders (1999) p 1829.
- Soldin JS, Hicks Jm. Pediatric reference ranges. Washington: AACC Press, (1996) p5.
- Arquivos da EBRAM.

