

USO

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 absorbância a 405 nm é proporcional à atividade de fosfatase alcalina presente na amostra.

ALP

p-Npp + H₂O-----> p-Nitrofenol + H₃PO₄

AMOSTRA.

Amostra: Soro ou plasma (colhido com heparina)

Armazenamento e estabilidade pré analítico : 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. Todavia, poderá ser modificado seguindo orientação médica.

Lactentes: antes da próxima mamada.

PRODUTO UTILIZADO

QUIMIFAL – FOSFATASE ALCALINA MS: **10159820163**

Fabricante: Ebram Produtos Laboratoriais Ltda.

Rua Julio de Castilhos, 500.

Belenzinho – São Paulo –SP – Brasil - CEP: 03059-001

Para maiores informações sobre sistemas automáticos, entrar em contato com o SAC EBRAM:

Tel. (011) 2291-2811 ou sac@ebram.com

EQUIPAMENTOS**• Procedimento Manual**

Espectrofotômetro ou fotômetro com cubeta termostaticada 37°C para leituras a 405 nm

Cubetas ou fluxo contínuo com 1.0 cm de passo óptico

Banho-Maria 37°C

Pipetas calibradas ou dispensador automático para reagentes e amostras

• Procedimento Automatizado

Indicar o nome, modelo e o local onde se encontra o equipamento analisador automatizado, fazendo referência ao manual (ou POP) para utilização do mesmo

• Procedimento alternativo

Indicar o equipamento alternativo e os respectivos procedimentos para medição dos ensaios. Enumerar as diferenças esperadas quando procedimentos manuais substituem automatizados.

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. 12024/7024 e 12031/7031.

PROCEDIMENTO**• 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). Reagente assim preparado permanece estável por 30 dias a 2 - 8°C.

1. Colocar 1,25 mL do reagente de trabalho no tubo referente ao soro controle.

2. Zerar o espectrofotômetro a 405 nm com água destilada.

3. Cuidadosamente, adicionar 20 µL do soro controle/amostra no tubo correspondente, homogeneizar e deixar em BM a 37°C. Acionar o cronômetro.

4. Registrar as absorbâncias A1, A2, A3, quando completar 1, 2 e 3 minutos respectivamente.

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

6. Determinar a média das diferenças de absorbância (Δ Abs/min). Proceder em seguida do mesmo modo com todas as amostras.

Nota: Realizar a incubação das amostras e soro controle individualmente.

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.

- **Procedimento Automatizado**

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

Aplicação no sistema semi-automático: Em um tubo de ensaio acrescentar 1,25 mL do reagente de trabalho, adicionar 20 µL de amostra/soro controle. Ler imediatamente no equipamento, preparar também um tubo contendo pelo menos 0,5 mL do reagente de trabalho (os equipamentos no início do procedimento, solicitam que seja introduzido o reagente para verificação da absorbância do reagente), seguir protocolo analítico específico baseado no item Parâmetros do Sistema. Pode-se utilizar o fator de calibração enunciado para o procedimento manual, pequenos ajustes podem ser necessários.

- **Precauções e cuidados especiais**

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 absorbância 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.

CÁLCULOS

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

$$\text{Fosfatase Alcalina Amostra U/L} = \text{Média } \Delta \text{ Abs/min} \times \text{Fator}$$

$$\text{Fator} = 3387$$

RESULTADOS

- Unidade de medida: U/L
- Unidade de Conversão, nkat/L = U/L x 16,7
- Valores de Referência

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.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- **Linearidade / Sensibilidade**

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 0 - 1500 U/L e os resultados devem ser multiplicados pelo fator de diluição.

Sensibilidade : 2,0 U/L

- **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.

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, tirotoxicose e hiperfosfatemia transiente benigna em crianças.

REFERÊNCIAS

1. Fujita, H., J. Biochem, (Japan) 30:69 (1969).
2. Bessey, O. A., Lowry, OH., Brook, M.J., J. Biol. Chem. 164:321 (1964).
3. Bowers, G. N., Jr., McComb, R.B., Clin. Chem. 12:70 (1966).
4. The Committee on Enzymes of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 32:291 (1974).
5. Wilkinson, J.H., et al, Clin. Chem. 15:487 (1969).
6. Young, D.S., et al, Clin. Chem. 21:1D (1975).
7. Demetriou, J.A., Drewes, P.^a, Gin, J.B., Clinical Chemistry; Principles and Technics, 2nd Ed., HagerstoWn(MD), Harper & Row, p. 927 (1974).
8. Rej., R., Clin. Chem. 23:1903 (1977).
9. Motta, Valter T., Bioquímica Clínica para o Laboratório, 4 ed., Médica Missau,(2003).
10. Arquivos da EBRAM.

	Nome	Assinatura	Data
Elaborado por			
Aprovado por			
Revisado por			
Desativado por			
Razão			