

QUIMIFAL – Fosfatase Alcalina

p-Nitrofenilfosfato

ANVISA: 10159820163



Finalidade

Reação enzimática para determinação quantitativa de fosfatase alcalina em amostra de soro ou plasma animal. 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 animais, 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 até 1 mês quando armazenado entre 2 e 8 °C ou por até 10 dias em temperatura ambiente, devendo ser mantido sempre 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

- 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.
- Cronômetro.

Amostra

Soro ou plasma (colhido com heparina). A fosfatase alcalina é estável por 3 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

Cães e Gatos

Jejum recomendado é de 8 a 12 horas (bioquímica) e em filhotes de 4 a 6h podendo beber água.

Deixar em repouso por 30 minutos.

Bovinos

Jejum geralmente não obrigatório.

Evitar estresse pois pode alterar o lactato.

Equinos

Jejum geralmente não obrigatório.

Evitar estresse pois pode alterar o lactato.

Aves

Jejum recomendado de 2 a 4 horas.

Evitar estresse do animal.

Mamíferos pequenos

Jejum geralmente não recomendado.

Evitar estresse do animal.

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
Relação Amostra/Reativo	1:50
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 à um calibrador mestre correlacionável a um método de referência, 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:

	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 nos tubos.
- Adicionar 20 µL do água destilada, calibrador, soro controle ou amostra, conforme o tubo correspondente.
- Homogeneizar e incubar em banho maria (BM) a 37°C por 1 minuto. Atenção: o nível de água no BM deve ser superior ao nível de reagentes nos tubos de ensaio.
- 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 ($\Delta \text{Abs}/\text{min}$), subtraindo cada leitura de sua anterior.
- Determinar a média das diferenças de absorvância ($\Delta \text{Abs}/\text{min}$). 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.=Absorbância)
(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:

Absorbância 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. idem 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

Caninos: 20 - 156 U/L
Felinos: 25 - 93 U/L
Bovinos: 0,0 - 488 U/L
Equinos: 143 - 395 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 foi 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 purificada). Para o enxágue da vidraria a água pode ser purificada, com resistividade $\geq 0,1$ megaohms ou condutividade ≤ 10 microsiemens. No enxágue final também utilizar água purificada.

Apresentação

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

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

Referência Bibliográfica

- Thomas L. Clinical laboratory Diagnostics. 1st ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft; 36-46 (1998).
- Tietz N., Textbook of Clinical Chemistry 3rd 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., McComb, R.B., Clin. Chem. 12:70 (1966).
- Young, D.S., et al, Clin. Chem. 21:1D (1975).
- Arquivos da EBRAM.

Revisão: Fevereiro de 2026

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
 Uso veterinário		

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

Dra. Nadjara Novaes Longen - CRF-SP - 37.451

SAC Ebram

Para mais informações, entrar em contato com o SAC 0800 500 2424 ou ☎ 11 2574 7110
sac@ebram.com | ebram.com.br

