

Inserir o nome do Laboratório	Procedimento Operacional Padrão QUIMIFAL – FOSFATASE ALCALINA	Página 1 de 4 POPBIOxxx/xx
--------------------------------------	--	---------------------------------------

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

ALP

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

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 parênquimas 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.

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

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.

Inserir o nome do Laboratório	Procedimento Operacional Padrão QUIMIFAL – FOSFATASE ALCALINA	Página 1 de 4 POPBIOxxx/xx
--------------------------------------	--	---------------------------------------

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 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 1,200 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 deterioração do reagente.

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.

MATERIAL NECESSÁRIO NÃO FORNECIDO

1. Banho-maria ou analisador capaz de manter uma temperatura de 37°C e capaz de medir absorbância 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.

PROCEDIMENTO

• **Procedimento automático:**

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

Aplicação no sistema semiautomático: 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:

	Branco	Calib	Amostra/S.C.
Água destilada	20 µL	-	-
Calibrador	-	20 µL	-
Amostra/S.C.	-	-	20 µL
Reagente de trabalho	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

- Adicionar 1,0 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 amostras 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)

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

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

RESULTADOS

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.

Inserir o nome do Laboratório	Procedimento Operacional Padrão QUIMIFAL – FOSFATASE ALCALINA	Página 1 de 4 POPBIOxxx/xx
--------------------------------------	--	---------------------------------------

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- **Linearidade / Sensibilidade**

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.

Sensibilidade: 1,0 U/L

- **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.

OBSERVAÇÕES

1. A limpeza e a secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
2. 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 enxague da vidraria a água pode ser do tipo III, com resistividade $\geq 0,1$ mega ohms ou condutividade ≤ 10 microsiemens. No enxague final utilizar água tipo II.

REFERÊNCIAS

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

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