



QUIMIFAL - Fosfatase Alcalina

p-Nitrofenilfosfato

REG. MS: 10159820163

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

Para mais informações, entrar em contato com o **SAC EBRAM**

0800 500 2424 ou 11 2574 7110

sac@ebram.com | www.ebram.com

FINALIDADE. Reação enzimática para determinação quantitativa de fosfatase alcalina em amostra de soro ou plasma. 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.



METODOLOGIA. p-Nitrofenilfosfato (IFCC)

SIGNIFICADO CLÍNICO. A fosfatase alcalina (FAL) está amplamente distribuída nos tecidos corpos, 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 parenterais 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 infeciosa, colangite, cirrose biliar primária, pancreatite aguda e crônica, neoplasias, hipertireoidismo, infarto, septicemia extra-hepática, infecções bacterianas intra-abdominais, síndrome de Fanconi, tireotoxicose e hiperfosfatemia transitória 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 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 deteriorização do reagente.

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. Cronômetro.

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.

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 à um calibrador mestre correlacionável à 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, segundo 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 μ L	-	-
Calibrador	-	20 μ L	-
Amostra/S.C.	-	-	20 μ L
Reagente de trabalho	1,00 mL	1,00 mL	1,00 mL

3. 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.
4. Adicionar 20 μ L do calibrador e 20 μ L de água destilada em cada tubo.
5. Aguardar 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 absorbâncias A1, A2, A3, considerando A1 a primeira leitura (logo após o 1º minuto de retardo) e as seguintes com 1 minuto de intervalo.
8. Determinar as duas diferenças de absorbância/min (Δ Abs/min), subtraindo cada leitura de sua anterior.
9. Determinar a média das diferenças de absorbância (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 μ L aumentam a imprecisão da medição em aplicações manuais.

CÁLCULOS.

(Abs.=Absorbância)
(Conc. = Concentração)

$$\Delta \text{Abs. /min} = (A_2 - A_1) + (A_3 - A_2) / 2$$

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

EXEMPLO:

Absorbância com o Calibrador

$$A_1 = 0,028 / A_2 = 0,060 / A_3 = 0,104$$

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

$$\text{Média } \Delta \text{Abs/min} = 0,038$$

$$\text{Média } \Delta \text{Abs/min (amostra)} = 0,034 \text{ (calc. idem acima)}$$

$$\text{Concentração do Calibrador} = 443 \text{ U/L}$$

$$\text{FAL Amostra} = (0,008 / 0,038) 443$$

$$\text{FAL Amostra} = 93 \text{ U/L}$$

$$\text{Obs: } \text{nkat/L} = \text{U/L} \times 16,67$$

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.

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)
Coeficiente 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 duplícata. 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.

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 enxágüe da vidraria a água pode ser do tipo III, com resistividade $\geq 0,1$ 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

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.

1. Thomas L. Clinical laboratory Diagnostics. 1st ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft; 36-46 (1998).
2. Tietz, N., Textbook of Clinical Chemistry 3rd 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.

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				