

# Fosfatase Alcalina - PP

Kit para determinação da fosfatase alcalina por metodologia cinética colorimétrica.

REF. 440

MS 80022230081



**Analisa**

## MÉTODO

Cinético-Colorimétrico.

## FINALIDADE

Reagentes para determinação da atividade da fosfatase alcalina no soro e plasma. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

## FUNDAMENTO

A fosfatase alcalina (FALC ou ALP) catalisa em meio alcalino a hidrólise do p-nitrofenilfosfato liberando p-nitrofenol e fosfato inorgânico. A atividade catalítica é determinada a partir da velocidade de formação do p-nitrofenol medida em 405 nm.



## SIGNIFICADO CLÍNICO

A fosfatase alcalina compreende um grupo de enzimas fosfohidrolases que apresentam atividade máxima em pH alcalino próximo de 10. A enzima é encontrada em vários tecidos, com maiores concentrações no fígado, no epitélio do trato biliar e no osso. A mucosa intestinal e a placenta contém também a fosfatase alcalina. A fosfatase alcalina apresenta várias isoenzimas, sendo que cada uma das fontes produtoras contém uma isoenzima específica. O fracionamento das isoenzimas da fosfatase alcalina é útil para diferenciar doenças ósseas de doenças hepáticas. As isoenzimas são melhor estudadas pelo teste de estabilidade ao calor e pelo fracionamento eletroforético. A isoenzima de origem hepática (ALP1) é termo-estável, enquanto que fração óssea (ALP2) é inativada pelo calor.

A determinação laboratorial da fosfatase alcalina se aplica muito bem para o diagnóstico de doenças do fígado e dos ossos.

**Valores elevados:** Cirrose, obstrução biliar intra e extra-hepática, tumor primário ou metastático do fígado, tumor metastático do osso, recuperação de fraturas ósseas, doença de Paget, hiperparatireoidismo, fases de crescimento normal dos ossos.

**Valores Diminuídos:** Hipotireoidismo, hipofosfatemia, desnutrição, doença celíaca.

## QUALIFICAÇÕES DO PRODUTO

- Metodologia cinética contínua colorimétrica, simples e rápida para a determinação da fosfatase alcalina facilmente adaptável em analisadores automáticos e semi-automáticos.
- O produto emprega reagentes líquidos, prontos para uso, possibilitando o preparo de um volume de Reagente de Trabalho adequado à rotina dos diversos laboratórios.
- A metodologia permite obter resultados exatos e precisos se for executada conforme descrita nesta Instrução de Uso.

## IDENTIFICAÇÃO DOS REAGENTES

Conservar entre 2-8 °C.

1. **Tampão** - Contém tampão pH 10,4, acetato de magnésio 2,5 mmol/L, sulfato de zinco 1,2 mmol/L, HEDTA 2,5 mmol/L e azida sódica 8 mmol/L.
2. **Substrato** - Contém p-nitrofenilfosfato 60 mmol/L e fenol 50 mmol/L.

## ESTABILIDADE

Os reagentes são estáveis até o vencimento da data de validade impressa no rótulo do produto e na caixa quando conservados na temperatura recomendada, bem vedados e se evite a contaminação durante o uso.

## Sinais de Deterioração dos Reagentes

Presença de partículas, turbidez e absorção do Reagente de Trabalho superior a 1,200 em 405 nm.

## MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS

- Espectrofotômetro com cubeta termostatizada (leitura em 405 nm);
- Pipetas e tubos;
- Cronômetro.

## PRECAUÇÕES E CUIDADOS ESPECIAIS

- Aplicar os cuidados habituais de segurança na manipulação dos reagentes e amostra biológica.
- Recomendamos o uso das Boas Práticas de Laboratórios Clínicos para a execução do teste.
- De acordo com as instruções de biossegurança, todas as amostras devem ser manuseadas como materiais potencialmente infectantes.
- O Tampão (1) contém azida sódica como conservante. Evitar contato com os olhos, pele e mucosa. Não aspirar ou ingerir.
- Descartar os reagentes e as amostras de acordo com as resoluções normativas locais, estaduais e federais de preservação do meio ambiente.

## AMOSTRA

SORO ou PLASMA (heparina).

O analito é estável por 7 dias entre 2-8 °C.

**Nota:** Recomendamos que a coleta, preparação, armazenamento e descarte das amostras biológicas sejam realizadas seguindo as recomendações das Boas Práticas de Laboratórios Clínicos.

Enfatizamos que os erros provenientes da amostra podem ser muito maiores do que os erros ocorridos durante o procedimento analítico.

## INFLUÊNCIAS PRÉ-ANALÍTICAS

Glicose e glicerol aumentam a atividade da enzima, atuando como aceptores de fosfatos.

Citrato, oxalato, EDTA e fluoreto inibem a atividade da fosfatase alcalina por formarem complexos com o magnésio, que é um importante ativador da enzima.

## INTERFERÊNCIAS

A bilirrubina até 32 mg/dL e hemólise (hemoglobina até 30 mg/dL) não interferem na reação de dosagem.

Hemólises mais acentuadas produzem resultados falsamente diminuídos.

Valores de triglicérides acima de 1800 mg/dL produzem resultados falsamente elevados.

## PROCEDIMENTO DO TESTE

### A. Condições de Reação

- Leitura: Comprimento de onda 405 nm
- Temperatura: 37 °C
- Tipo de Reação: Cinética contínua crescente

### Preparo do Reagente de Trabalho

De acordo com o consumo, misturar suavemente os reagentes 1 e 2 na seguinte proporção: 4 volumes de Tampão (1) mais 1 volume de Substrato (2).

Estável por 30 dias entre 2-8 °C.

### B. Técnica de Análise sem Calibrador

#### 1. Pipetar na cubeta:

Reagente de trabalho	1000 µL
Amostra	20 µL

2. Homogeneizar e inserir a cubeta no porta-cubetas termostatizado (37 °C). Acionar o cronômetro.

3. Após 1 minuto, fazer a leitura da absorbância inicial ( $A_0$ ).

4. Fazer novas leituras de absorbância, após exatamente 1, 2 e 3 minutos.

5. As diferenças entre as absorbâncias ( $\Delta A/\text{minuto}$ ) devem ser praticamente iguais, indicando a linearidade do método.

6. Calcular o aumento médio de absorbância por minuto ( $\Delta A/\text{min}$ ).

### Cálculos

Ver Linearidade.

$\Delta A/\text{min}$  = Variação média da absorbância por minuto.

Considerando que o coeficiente de absorção milimolar do p-nitrofenol em 405 nm é igual a 18,45 tem-se o seguinte fator para calcular a atividade catalítica da fosfatase alcalina:

Fosfatase Alcalina (U/L) =  $\Delta A/\text{min} \times 2764$

### Exemplo

Se  $\Delta A/\text{minuto}$  médio = 0,052

Fosfatase Alcalina =  $0,052 \times 2764 = 144 \text{ U/L}$

### Cálculo do Fator

$$\text{Fator} = \frac{V_t \times 1000}{\epsilon \times V_a \times d}$$

$V_t$  = Volume total do ensaio = 1,02 mL

$V_a$  = Volume de amostra = 0,02 mL

1000 = Conversão de U/mL para U/L

$d$  = espessura da cubeta, via da luz (1 cm)

$\epsilon$  = absorbância milimolar do p-nitrofenol em 405 nm = 18,45

$$\text{Fator} = \frac{1,02 \times 1000}{18,45 \times 0,02 \times 1} = 2764$$

### C. Técnica de Análise com Calibrador REF. 410 da Gold Analisa

#### 1. Pipetar na cubeta:

Reagente de trabalho	1000 µL
Amostra ou Calibrador	20 µL

2. Homogeneizar e inserir a cubeta no porta-cubetas termostatizado (37 °C). Acionar o cronômetro.

3. Após 1 minuto, fazer a leitura da absorbância inicial ( $A_0$ ).

4. Fazer novas leituras de absorbância, após exatamente 1, 2 e 3 minutos.

5. As diferenças entre as absorbâncias ( $\Delta A/\text{minuto}$ ) devem ser praticamente iguais, indicando a linearidade do método.

6. Calcular o aumento médio de absorbância por minuto do Calibrador e do Teste ( $\Delta A/\text{minuto}$  médio).

### Notas

1. Utilizar o Calibrador REF. 410 da Gold Analisa. Ver Instruções de Uso e valor tabelado para fosfatase alcalina.

2. O desempenho do Calibrador pode ser afetado por vários fatores como: erros de reconstituição, de homogeneização, armazenamento incorreto, contaminação da água ou vidraria.

### Cálculos

Ver Linearidade.

Como a metodologia obedece a lei de Lambert-Beer, pode-se efetuar os cálculos através do Fator de Calibração (FC).

$\Delta A/\text{minuto médio} = \text{Variação média da absorbância por minuto.}$

AC = Atividade de Fosfatase Alcalina do Calibrador

AC = x U/L (Valor indicado na tabela do Calibrador)

AT = Atividade de Fosfatase Alcalina do Teste em U/L

AT =  $\Delta A/\text{minuto do Teste} \times \text{FC}$

FC = Fator de Calibração =  $\text{AC} \div \Delta A/\text{minuto médio do Calibrador}$

### Exemplo

Se  $\Delta A/\text{minuto médio do Calibrador} = 0,158$

Se  $\Delta A/\text{minuto médio do Teste} = 0,052$

Se AC = 432 U/L (Valor indicado na tabela do Calibrador)

FC =  $\text{AC} \div \Delta A/\text{minuto médio do Calibrador} = 432 \div 0,158 = 2734$

AT em U/L =  $0,052 \times \text{FC} = 0,052 \times 2734 = 142 \text{ U/L}$

### Atenção

- As técnicas apresentadas são adequadas para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 1000 µL.
- O analista sempre deve fazer uma verificação da necessidade de ajuste do volume para o fotômetro empregado no seu laboratório.
- Os volumes de amostra e de reagente podem ser modificados proporcionalmente, sem alterar o desempenho do teste e os cálculos.
- Em caso de redução dos volumes é necessário observar o volume mínimo de leitura fotométrica.
- Volumes da amostra menores do que 10 µL são críticos em aplicações manuais e devem ser usados com cautela porque aumentam a imprecisão da medição.

### EFEITO DA TEMPERATURA

Através da Tabela apresentada abaixo, pode-se converter valores de atividade obtidos em uma temperatura para valores em outras temperaturas.

Temperatura de medida	Fatores de conversão para outras temperaturas		
	25 °C	30 °C	37 °C
25 °C	-----	1,45	2,08
30 °C	0,69	-----	1,43
37 °C	0,48	0,70	-----

### VALORES DE REFERÊNCIA

Adultos: 27 a 100 U/L.

Crianças e adolescentes até 16 anos: 75 a 390 U/L.

Estes valores devem ser usados como uma orientação. É recomendado que cada laboratório estabeleça seus próprios valores de referência.

### AUTOMAÇÃO

Este kit pode ser utilizado na maioria dos analisadores automáticos.

O consumidor poderá solicitar mais informações através do Setor de Apoio ao Cliente (SAC) ou acessando o site [www.goldanalisa.com.br](http://www.goldanalisa.com.br).

### CONTROLE DA QUALIDADE

O laboratório clínico deve manter um Programa de Garantia da Qualidade para assegurar que todos os procedimentos laboratoriais sejam realizados de acordo com as Boas Práticas de Laboratórios Clínicos.

Para controle e verificação do desempenho do kit usar Soro Controle N e Soro Controle P da Gold Analisa.

É importante que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores médios e os respectivos limites de variação.

### CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO<sup>9</sup>

#### Linearidade

A reação é linear até 1500 U/L. Para valores maiores, diluir a amostra com solução de NaCl 150 mmol/L (0,85%) e realizar uma nova determinação. Multiplicar o valor obtido pelo fator de diluição empregado.

#### Repetitividade

A imprecisão intra-ensaio foi calculada com 10 determinações sucessivas de fosfatase alcalina, utilizando duas amostras de soro com concentrações diferentes.

As médias dos coeficientes de variação obtidas foram de 1,0 e 0,7%.

#### Reprodutibilidade

A imprecisão inter-ensaio foi calculada com 10 determinações de fosfatase alcalina em dias diferentes, utilizando duas amostras de soro com concentrações diferentes.

As médias dos coeficientes de variação obtidas foram de 3,4 e 1,1%.

### OBSERVAÇÕES

1. A observação minuciosa da limpeza e secagem da vidraria, da estabilidade dos reagentes, da pipetagem, da temperatura e do tempo de reação é de extrema importância para se obter resultados precisos e exatos.
2. Na limpeza da vidraria pode-se empregar um detergente neutro ou uma solução ácida. A última lavagem deve ser feita com água destilada ou deionizada.
3. A água utilizada nos laboratórios clínicos deve ser purificada utilizando-se métodos adequados para as finalidades de uso. Colunas deionizadoras saturadas liberam diversos íons, aminas e agentes oxidantes que deterioram os reativos.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Fundamento de Química Clínica, 4a Ed - Guanabara Koogan SA; 1998.
2. Deutschen Gesellschaft fur Klinische Chmie. Z Klin Chem Klin Biochem 1970; 8:658-660.
3. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. J ClinmChem Clin Biochem 1983;21:731-748.
4. Kaplan A, Szabo LL, Opheim KE. Clinical Chemistry: Interpretation and Techniques. Philadelphia: Lea & Febiger 1988:190-191.
5. Lopes HJJ. Enzimas no Laboratório Clínico-Aplicações Diagnósticas. Belo Horizonte, Analisa Diagnóstica, 1998.
6. Scand J Clin Lab Invest 1974; 33: 291-306
7. Sociedad Española de Química Clínica, Comité Científico, Comisión de Enzimas. Bol Inf SEQC 1991;63:1-7.
8. The Committee on Enzymes of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology.
9. GOLD ANALISA: Informe Técnico do Produto.

### APRESENTAÇÃO

REF.	Nº de Testes	Reagentes	Volume
440M	30	Tampão	1 x 24 mL
		Substrato	1 x 6 mL
440	60	Tampão	2 x 24 mL
		Substrato	2 x 6 mL
440E	120	Tampão	4 x 24 mL
		Substrato	4 x 6 mL

### TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

Lei nº 8.078 de 11-9-90 - Código de Defesa do Consumidor

A Gold Analisa garante a substituição, sem ônus para o consumidor, de todos os produtos que comprovadamente apresentarem problemas técnicos, desde que o usuário utilize equipamentos e materiais em boas condições técnicas, siga rigorosamente o procedimento técnico e as recomendações estabelecidas nas Instruções de Uso.

Nº do lote e data de validade: Vide Rótulos do Produto

Gold Analisa Diagnóstica Ltda - CNPJ: 03.142.794/0001-16

AF MS Nº 800222-3 - Reg. MS - Nº 80022230081

Farm. Resp. José Gilmar Pereira Berto - CRF-MG 13421

Av. Nossa Senhora de Fátima, 2363 - Carlos Prates - Fone: (31) 3272-1888

Belo Horizonte MG Brasil CEP: 30710-020

Home page: [www.goldanalisa.com.br](http://www.goldanalisa.com.br)

E-mail: [goldanalisa@goldanalisa.com.br](mailto:goldanalisa@goldanalisa.com.br)

Setor de Apoio ao Cliente (SAC): 0800 703 1888

Analisa é marca registrada da Gold Analisa Diagnóstica Ltda

### SIMBOLOGIA

	Número do catálogo		Limite de temperatura
	Número do lote		Quantidade de testes
	Produto para diagnóstico <i>in vitro</i>		Consultar as instruções de uso
	Data limite de utilização		Fabricado por

Revisão: 01/18