

# Fosfatase Alcalina | Fosfatasa Alcalina

Kit para determinação da fosfatase alcalina em amostras de sangue (soro, plasma) por método cinético de tempo fixo e medição de ponto final.

Kit para la determinación de fosfatasa alcalina en muestras de sangre (suero, plasma) por método cinético de tiempo fijo y medición de punto final.

Ref: 340  
MS 80022230142

## MÉTODO

Cinético-Colorimétrico (Roy modificado).

## FINALIDADE

Reagentes para determinação da atividade da fosfatase alcalina no soro ou plasma por método cinético de tempo fixo e medição de ponto final.

Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

## FUNDAMENTO

A fosfatase alcalina do soro hidrolisa o substrato de timolfaleína monofosfato, liberando timolfaleína e fosfato inorgânico.

Pela adição de álcali, a ação enzimática é inibida e a timolfaleína adquire cor azul, cuja absorbância é medida fotometricamente.

A cor do produto final da reação é resultante da mistura de cor azul e a cor própria do substrato.

## 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 contêm 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 (ALP) 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 MÉTODO

- Metodologia cinética colorimétrica de tempo fixo, simples e rápida para a determinação da fosfatase alcalina.
- Utiliza a timolfaleína monofosfato como substrato que permite a medida direta do produto de hidrólise, apenas alterando o pH. O substrato é estável na temperatura ambiente, não sofrendo auto-hidrólise.

## IDENTIFICAÇÃO DOS REAGENTES

Conservar em temperatura ambiente (15-25 °C).

1. **Padrão** - Contém timolfaleína 0,45 mmol/L e solubilizante.
2. **Substrato** - Contém timolfaleína monofosfato  $\leq$  25 mmol/L e solubilizadores. Não refrigerar. O reagente pode apresentar precipitado ou turvação, fato que não interfere na qualidade do mesmo. Agitar antes de usar. Manter o frasco bem vedado para evitar evaporação.
3. **Tampão** - Contém tampão  $\leq$ 330 mmol/L pH 10-10,5, cofator, surfactante e conservante.
4. **Reagente de Cor** - Contém carbonato de sódio 94 mmol/L, hidróxido de sódio 250 mmol/L e formol 0,5%.

## Notas

1. O Substrato (2) poderá apresentar turvação ou precipitado, fato que não interfere na sua eficácia. Agitar antes de usar.
2. Manter os frascos do Padrão (1) e do Substrato (2) bem vedados para evitar a evaporação dos solventes.
3. O Tampão (3) deve ser mantido aberto o menor tempo possível, para não ser contaminado com CO<sub>2</sub> atmosférico. Não soprar dentro do frasco para evitar alteração do pH da solução pela introdução de CO<sub>2</sub>.

## 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.

## MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS

- Espectrofotômetro (leitura entre 580 e 590 nm);
- Banho-maria ou termostator na temperatura constante de 37 °C;
- 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 Reagente de Cor (4) é corrosivo. Contato com os olhos, pele ou mucosas devem ser evitados. Não aspirar ou ingerir.
- Como ocorre em toda reação enzimática, a rigorosa observação do tempo e da temperatura de incubação é de grande importância para a qualidade dos resultados obtidos. A diferença de 1 minuto no tempo de incubação desta dosagem introduz um erro de 10% nos resultados.
- Descartar os reagentes e as amostras de acordo com as resoluções normativas locais, estaduais e federais de preservação do meio ambiente.

## 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.

## AMOSTRA

SORO ou PLASMA (heparina).

A enzima é estável 7 dias entre 2-8 °C e vários meses a 20 °C negativos.

**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.

## INTERFERÊNCIAS

A bilirrubina até 38 mg/dL, lipemia (triglicérides até 250 mg/dL) e hemólise (hemoglobina até 30 mg/dL) não produzem interferências significativas.

Hemólises mais acentuadas produzem resultados falsamente diminuídos.

Valores de triglicérides acima de 250 mg/dL produzem resultados falsamente elevados por interferência fotométrica. Nestes casos, empregar um Branco de Amostra, que é aplicável para valores de Triglicérides até 1800 mg/dL.

Para avaliar a concentração aproximada da Hemoglobina em uma amostra hemolisada, pode-se proceder do seguinte modo:

-Diluir 0,05 mL da amostra em 2,0 mL de NaCl 150 mmol/L (0,85%) e medir a absorbância em 405 ou 415 nm, acertando o zero com água deionizada ou destilada.

Hemoglobina (mg/dL) = Absorbância<sub>405</sub> x 601

Hemoglobina (mg/dL) = Absorbância<sub>415</sub> x 467

**Branco de Amostra:** Misturar 2,5 mL de NaCl 150 mmol/L (0,85%) com 0,05 mL da amostra. Medir a absorbância em 590 nm, acertando o zero com água destilada ou deionizada. Subtrair a absorbância assim obtida, da absorbância do teste e calcular a concentração. Este sistema de correção é aplicável apenas nos casos em que a amostra produz interferência fotométrica.

## PROCEDIMENTO DO TESTE

### A. Condições de Reação

- Leitura: Comprimento de onda 590 nm
- Medida: Contra o Branco da reação
- Tipo de reação: Cinética de tempo fixo

### B. Dosagem no Soro ou Plasma

1. Identificar três tubos de ensaio Branco, Teste e Padrão e proceder:

| Tubos         | Branco  | Teste   | Padrão  |
|---------------|---------|---------|---------|
| Substrato (2) | 0,05 mL | 0,05 mL | 0,05 mL |
| Tampão (3)    | 0,5 mL  | 0,5 mL  | 0,5 mL  |
| Padrão (1)    | -----   | -----   | 0,05 mL |

2. Homogeneizar e incubar os tubos em banho-maria a 37 °C por 2 minutos.

O nível de água do banho-maria deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos.

Não retirar os tubos do banho-maria para adicionar a amostra.

|      |       |         |       |
|------|-------|---------|-------|
| Soro | ----- | 0,05 mL | ----- |
|------|-------|---------|-------|

3. Homogeneizar e incubar a 37 °C por 10 minutos (**CRONOMETRAR**)

|                     |      |      |      |
|---------------------|------|------|------|
| Reagente de Cor (4) | 2 mL | 2 mL | 2 mL |
|---------------------|------|------|------|

4. Homogeneizar e fazer as leituras fotométricas em 590 nm ou em filtro laranja (580 a 590 nm), acertando o zero com o Branco.

A cor é estável por 120 minutos.

O procedimento sugerido para a medição é adequado para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 2,5 mL.

Deve ser feita uma verificação da necessidade de ajuste do volume para o fotômetro utilizado. Os volumes de amostra e reagente podem ser modificados proporcionalmente, sem prejuízo para o desempenho do teste, e o procedimento de cálculo se mantém inalterado. Em caso de redução dos volumes é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a leitura fotométrica. Volumes da amostra menores que 0,01 mL são críticos em aplicações manuais e devem ser usados com cautela porque aumentam a imprecisão da medição.

## Cálculos

Ver Linearidade.

Fosfatase Alcalina (U/L) = Absorbância do Teste ÷ Absorbância do Padrão x 45

### Exemplo:

Absorbância do Teste = 0,295

Absorbância do Padrão = 0,360

Fosfatase Alcalina (U/L) = 0,295 ÷ 0,360 x 45 = 37

Devido a grande reprodutibilidade que pode ser obtida com a metodologia o método do fator pode ser empregado.

Fator de Calibração = 45 ÷ Absorbância do Padrão

Fosfatase Alcalina (U/L) = Absorbância do Teste x Fator

### Exemplo:

Fator de Calibração = 45 ÷ 0,360 = 125

Fosfatase Alcalina (U/L) = 0,295 x 125 = 37

## Atenção

- 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.

## VALORES DE REFERÊNCIA

Os valores de referência variam em função da idade.

### Soro ou plasma

1. **Adultos:** 13 a 43 U/L.

2. **Crianças até 12 anos:** 56 a 156 U/L.

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

**Definição de Unidade:** Uma unidade é igual a quantidade de enzima que libera por hidrólise 1 micromol de timolftaleína por minuto, por litro de soro nas condições do teste.

## AUTOMAÇÃO

Este kit pode ser utilizado na maioria dos analisadores semi-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 podem ser utilizadas amostras controle com valores estabelecidos pelos fabricantes.

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

## CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO<sup>8</sup>

### Linearidade

A reação é linear até 500 U/L com cinética de ordem zero.

Para valores de absorbância acima de 2,0 proceder da seguinte maneira:

- a) Diluir o conteúdo dos tubos Teste e o Branco com o Reagente de Cor (4),
- b) Efetuar nova leitura fotométrica,
- c) Multiplicar o valor obtido pelo fator de diluição empregado.

Se o valor for ainda maior que 500 U/L:

- a) Repetir o ensaio reduzindo o tempo de incubação após a adição da amostra para 2 minutos.
- b) Multiplicar o valor obtido por 5.

### Exatidão

Em duas amostras com valores de fosfatase alcalina iguais a 56 e 159 U/L foram adicionadas quantidades diferentes da enzima, obtendo-se recuperações entre 100 e 112%. O erro sistemático proporcional médio obtido em um valor de 50 U/L foi igual a 2,5 U/L ou 5,0%.

### Especificidade

O método proposto foi comparado com o método PNP utilizando 80 amostras com valores situados entre 17 e 182 U/L. A comparação resultou na equação da regressão:  $y = 13,4 + 0,307x$  e um coeficiente de correlação (r) igual a 0,96. É evidente uma correlação positiva entre os dois métodos, observando-se uma diferença sistemática de 42% quando se usa um nível de decisão igual a 50 U/L, que é explicada pela diferença entre os substratos e as metodologias utilizadas.

### Repetitividade

A imprecisão intra-ensaio foi calculada com 20 determinações sucessivas de fosfatase alcalina utilizando duas amostras de soro com concentrações diferentes.

As médias dos coeficientes de variação obtidas foram de 2,4 e 1,6%.

### Reprodutibilidade

A imprecisão inter-ensaio foi calculada com 20 determinações de fosfatase alcalina em dias diferentes, utilizando duas amostras de soro com concentrações diferentes.

As médias dos coeficientes de variação obtidas foram de 2,4 e 2,6%.

### Sensibilidade Analítica

O limite de detecção é igual a 0,125 U/L, equivalente a uma absorbância de 0,001 utilizando a absorbância do Padrão como parâmetro.

## Efeitos da diluição da matriz

Dois amostras com valores iguais a 844 e 1026 U/L foram utilizadas para avaliar a resposta do sistema na avaliação da diminuição do tempo de incubação. Usando tempos de incubação que variaram de 1 a 5 minutos, encontrou-se recuperações entre 95 e 103%.

## Comparação de Métodos

O produto foi comparado com outro disponível no mercado através da análise de 80 amostras de soro humano com valores de fosfatase alcalina desconhecidos. Os resultados analisados por modelos estatísticos demonstraram que não há diferença significativa em um intervalo de confiança de 95% com um coeficiente de correlação linear  $r = 0,96$  e uma equação de regressão  $y = 0,307x + 13,4$ .

## 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.
4. A presença de íons cálcio, fosfato, amônio e borato inibem a enzima.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Coleman CM, Stroj RC. Clin Chim Acta 1966;13:401
2. King E.J. J Path Bact. 1943;55:31.
3. Roy AV. Clin Chem 1970;16:431.
4. Tonks DB. Quality Control in Clinical Laboratories, Warner-Chilcott Laboratories, Diagnostic Reagents Division, Scarborough, Canada, 1972.
5. Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T. J. 1981;27:493-501.
6. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Base de Datos de Variación Biológica. Disponíveis em: <[http://www.seqc.es/articulo/ar\\_ticleview/330/1/170](http://www.seqc.es/articulo/ar_ticleview/330/1/170)> (acesso em 04/2006)
7. GOLD ANALISA: Informe Técnico do Produto.

## 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 80022230142

Farm. Resp. Isabela Fernandes dos Santos - CRF-MG 16773

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                           |  | Consultar as instruções de uso |
|  | Produto para diagnóstico <i>in vitro</i> |  | Fabricado por                  |
|  | Data limite de utilização                |   |                                |

Revisão: 05/22

# Fosfatase Alcalina | Fosfatasa Alcalina

Kit para determinação da fosfatase alcalina em amostras de sangue (soro, plasma) por método cinético de tempo fixo e medição de ponto final.

Kit para la determinación de fosfatasa alcalina en muestras de sangre (suero, plasma) por método cinético de tiempo fijo y medición de punto final.

Ref: 340  
MS 80022230142

## MÉTODO

Cinético-Colorimétrico (Roy modificado).

## META

Reactivos para la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina en suero o plasma mediante el método cinético de tiempo fijo y la medición del punto final. Sólo para uso diagnóstico in vitro.

## ANTECEDENTES

La fosfatasa alcalina sérica hidroliza el sustrato de monofosfato de timolfaleína, liberando timolfaleína y fosfato inorgánico.

Al agregar álcali, se inhibe la acción enzimática y la timolfaleína adquiere un color azul, cuya absorbancia se mide fotométricamente.

El color del producto final de la reacción es el resultado de mezclar el color azul y el color propio del sustrato.

## SIGNIFICACIÓN CLÍNICA

La fosfatasa alcalina comprende un grupo de enzimas fosfohidrolasas que tienen una actividad máxima a pH alcalino, cercano a 10.

La enzima se encuentra en varios tejidos, con concentraciones más altas en el hígado, el epitelio del tracto biliar y el hueso. La mucosa intestinal y la placenta también contienen fosfatasa alcalina.

La fosfatasa alcalina tiene varias isoenzimas y cada una de las fuentes de producción contiene una isoenzima específica. El fraccionamiento de las isoenzimas de fosfatasa alcalina (ALP) es útil para diferenciar enfermedades óseas de enfermedades hepáticas.

Las isoenzimas se estudian mejor mediante pruebas de estabilidad al calor y fraccionamiento electroforético.

La isoenzima de origen hepático (ALP1) es termoestable, mientras que la fracción ósea (ALP2) se inactiva por calor.

La determinación de laboratorio de fosfatasa alcalina es muy adecuada para el diagnóstico de enfermedades hepáticas y óseas.

Valores elevados: Cirrosis, obstrucción biliar intra y extrahepática, tumor hepático primario o metastásico, tumor óseo metastásico, cicatrización de fracturas óseas, enfermedad de Paget, hiperparatiroidismo, fases de crecimiento óseo normal.

Valores Disminuidos: Hipotiroidismo, hipofosfatemia, desnutrición, enfermedad celíaca.

## CALIFICACIONES DEL MÉTODO

- Metodología cinética colorimétrica a tiempo fijo, simple y rápida para la determinación de fosfatasa alcalina.
- Utiliza monofosfato de timolfaleína como sustrato que permite la medición directa del producto de hidrólisis, simplemente cambiando el pH. El sustrato es estable a temperatura ambiente y no sufre autohidrólisis.

## IDENTIFICACIÓN DE REACTIVOS

Conservar a temperatura ambiente (15-25°C).

1. **Estándar** - Contiene 0,45 mmol/L de timolfaleína y solubilizante.
2. **Sustrato** - Contiene monofosfato de timolfaleína  $\leq$  25 mmol/L y solubilizantes. No refrigere. El reactivo puede presentar precipitación o turbidez, hecho que no interfiere en su calidad. Agitar antes de usar. Mantenga el vial bien cerrado para evitar la evaporación.
3. **Tampón** - Contiene tampón  $\leq$ 330 mmol/L pH 10-10,5, cofactor, tensioactivo y conservante.
4. **Reactivo de color**: contiene 94 mmol/L de carbonato de sodio, 250 mmol/L de hidróxido de sodio y 0,5 % de formaldehído.

## Los grados

1. El Sustrato (2) puede presentar turbidez o precipitación, hecho que no interfiere en su eficacia. Agitar antes de usar.
2. Mantenga los viales de estándar (1) y sustrato (2) bien sellados para evitar la evaporación del solvente.
3. El Tapón (3) debe mantenerse abierto el menor tiempo posible, para no contaminarse con el CO<sub>2</sub> atmosférico. No sople en el vial para evitar cambiar el pH de la solución debido a la introducción de CO<sub>2</sub>.

## ESTABILIDAD

Los reactivos son estables hasta la fecha de vencimiento impresa en la etiqueta y la caja del producto cuando se almacenan a la temperatura recomendada, se sellan herméticamente y se evita la contaminación durante el uso.

## MATERIALES NECESARIOS Y NO SUMINISTRADOS

- Espectrofotómetro (lectura entre 580 y 590 nm);
- Baño María o termostato a temperatura constante de 37 °C;
- pipetas y tubos;
- Cronógrafo.

## PRECAUCIONES Y CUIDADOS ESPECIALES

- Aplique las precauciones de seguridad habituales al manipular reactivos y muestras biológicas.
- Recomendamos el uso de Buenas Prácticas de Laboratorio Clínico para la realización de la prueba.

- De acuerdo con las instrucciones de bioseguridad, todas las muestras deben manipularse como materiales potencialmente infecciosos.
- El reactivo de color (4) es corrosivo. Debe evitarse el contacto con los ojos, la piel o las mucosas. No aspirar ni ingerir.
- Como en toda reacción enzimática, la observación estricta del tiempo y la temperatura de incubación es de gran importancia para la calidad de los resultados obtenidos. La diferencia de 1 minuto en el tiempo de incubación de esta dosificación introduce un error del 10% en los resultados.
- Deseche los reactivos y las muestras de acuerdo con las resoluciones reglamentarias locales, estatales y federales para la preservación del medio ambiente.

## INFLUENCIAS PREANALÍTICAS

La glucosa y el glicerol aumentan la actividad enzimática, actuando como aceptores de fosfato.

El citrato, el oxalato, el EDTA y el fluoruro inhiben la actividad de la fosfatasa alcalina formando complejos con el magnesio, que es un importante activador de la enzima.

## MUESTRA

SUERO o PLASMA (heparina).

La enzima es estable durante 7 días a 2-8 °C y varios meses a menos 20 °C.

**Nota:** Recomendamos que la recolección, preparación, almacenamiento y disposición de muestras biológicas se realice siguiendo las recomendaciones de Buenas Prácticas de Laboratorio Clínico.

Hacemos hincapié en que los errores derivados de la muestra pueden ser mucho mayores que los errores que se produjeron durante el procedimiento analítico.

## INTERFERENCIAS

Bilirrubina hasta 38 mg/dL, lipemia (triglicéridos hasta 250 mg/dL) y hemólisis (hemoglobina hasta 30 mg/dL) no producen interferencias significativas.

La hemólisis más pronunciada produce resultados falsamente disminuidos.

Los valores de triglicéridos superiores a 250 mg/dL producen resultados falsamente elevados debido a la interferencia fotométrica. En estos casos, utilice un blanco de muestra, que es

Aplicable para valores de Triglicéridos hasta 1800 mg/dL.

Para evaluar la concentración aproximada de Hemoglobina en una muestra hemolizada, proceda de la siguiente manera:

- Diluir 0,05 mL de la muestra en 2,0 mL de NaCl 150 mmol/L (0,85%) y medir la absorbancia a 405 o 415 nm, poniendo a cero con agua desionizada o destilada.

Hemoglobina (mg/dL) = Absorbancia<sub>405</sub> x 601

Hemoglobina (mg/dL) = Absorbancia<sub>415</sub> x 467

**Blanco de muestra:** Mezcle 2,5 mL de 150 mmol/L NaCl (0,85 %) con 0,05 mL de muestra. Mida la absorbancia a 590 nm, poniendo a cero con agua destilada o desionizada. Reste la absorbancia así obtenida de la absorbancia de la prueba y calcule la concentración. Este sistema de corrección es aplicable únicamente en los casos en que la muestra produzca interferencia fotométrica.

## PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

### A. Condiciones de reacción

- Lectura: Longitud de onda 590 nm
- Medición: contra el blanco de reacción
- Tipo de reacción: cinética de tiempo fijo

### B. Dosis en Suero o Plasma

1. Identifique tres tubos de ensayo blancos, de prueba y estándar y proceda:

| Tubos            | Blanco  | Prueba  | Patrón  |
|------------------|---------|---------|---------|
| Sustrato (2)     | 0,05 mL | 0,05 mL | 0,05 mL |
| Amortiguador (3) | 0,5 mL  | 0,5 mL  | 0,5 mL  |
| Estándar (1)     | -----   | -----   | 0,05 mL |

2. Homogeneizar e incubar los tubos al baño maría a 37°C durante 2 minutos.

El nivel del agua en el baño de agua debe ser superior al nivel de los reactivos en los tubos..

No retire los tubos del baño de agua para agregar la muestra.

|       |       |         |       |
|-------|-------|---------|-------|
| Suero | ----- | 0,05 mL | ----- |
|-------|-------|---------|-------|

3. Homogeneizar e incubar a 37°C durante 10 minutos (TEMPORIZADOR DE TIEMPO)

|                       |      |      |      |
|-----------------------|------|------|------|
| Reactivo de color (4) | 2 mL | 2 mL | 2 mL |
|-----------------------|------|------|------|

4. Homogeneizar y tomar las lecturas fotométricas a 590 nm o en filtro naranja (580 a 590 nm), poniendo a cero con el blanco.

El color es estable durante 120 minutos.

El procedimiento de medida sugerido es adecuado para fotómetros cuyo volumen mínimo de solución para lectura sea igual o inferior a 2,5 mL.

Se debe comprobar la necesidad de ajustar el volumen para el fotómetro utilizado. Los volúmenes de muestra y reactivo se pueden modificar proporcionalmente, sin afectar el rendimiento de la prueba, y el procedimiento de cálculo permanece sin cambios. En

caso de reducción de volumen, es imprescindible observar el volumen mínimo necesario para la lectura fotométrica. Los volúmenes de muestra inferiores a 0,01 ml son fundamentales en las aplicaciones manuales y deben utilizarse con precaución, ya que aumentan la imprecisión de la medición.

#### Cálculos

Ver Linealidad.

$$\text{Fosfatasa alcalina (U/L)} = \text{Absorbancia de prueba} \div \text{Absorbancia estándar} \times 45$$

#### Ejemplo:

Prueba de absorbancia = 0,295  
Absorbancia estándar = 0,360  
Fosfatasa Alcalina (U/L) = 0.295 ÷ 0.360 x 45 = 37

Debido a la gran reproducibilidad que se puede obtener con la metodología, se puede utilizar el método factorial.

$$\text{Factor de calibración} = 45 \div \text{Absorbancia estándar}$$

$$\text{Fosfatasa Alcalina (U/L)} = \text{Prueba de Absorbancia} \times \text{Factor}$$

#### Ejemplo:

Factor de Calibración = 45 ÷ 0.360 = 125  
Fosfatasa Alcalina (U/L) = 0.295 x 125 = 37

#### Aviso

- El analista siempre debe verificar la necesidad de ajuste de volumen para el fotómetro utilizado en su laboratorio.
- Los volúmenes de muestra y reactivo se pueden modificar proporcionalmente sin cambiar el rendimiento y los cálculos de la prueba.
- En caso de reducción de volumen, es necesario observar el volumen mínimo de lectura fotométrica.

#### VALORES DE REFERENCIA

Los valores de referencia varían según la edad.

#### Suero o plasma

- Adultos: 13 a 43 U/L.
- Niños hasta 12 años: 56 a 156 U/L.

Estos valores deben usarse como una guía. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

**Definición de Unidad:** Una unidad es igual a la cantidad de enzima que hidroliza 1 micromol de timolftaleína por minuto por litro de suero bajo las condiciones de la prueba.

#### AUTOMATIZACIÓN

Este kit se puede utilizar en la mayoría de los analizadores semiautomáticos.

El consumidor podrá solicitar más información a través del Sector de Atención al Cliente (SAC) o accediendo al sitio web [www.goldanalisa.com.br](http://www.goldanalisa.com.br)

#### CONTROL DE CALIDAD

El laboratorio clínico debe mantener un Programa de Garantía de Calidad para garantizar que todos los procedimientos de laboratorio se realicen de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio Clínico.

Para el control y verificación del desempeño del kit se pueden utilizar muestras de control con valores establecidos por los fabricantes.

Es importante que cada laboratorio establezca sus propios valores medios y los respectivos límites de variación.

#### CARACTERÍSTICAS DE PRESENTACIÓN<sup>8</sup>

linealidad

- La reacción es lineal hasta 500 U/L con cinética de orden cero.
- Para valores de absorbancia superiores a 2,0, proceda de la siguiente manera:
- Diluir el contenido de los Tubos de Ensayo y el Blanco con el Reactivo de Color (4).
- Efectuar una nueva lectura fotométrica.
- Multiplicar el valor obtenido por el factor de dilución utilizado.
- Si el valor es incluso superior a 500 U/L:
- Repita el ensayo reduciendo el tiempo de incubación después de la adición de la muestra a 2 minutos.
- Multiplica el valor obtenido por 5.

#### Precisión

En dos muestras con valores de fosfatasa alcalina iguales a 56 y 159 U/L, se adicionaron diferentes cantidades de la enzima, obteniendo recuperaciones entre 100 y 112%. El error sistemático proporcional medio obtenido a un valor de 50 U/L fue igual a 2,5 U/L o 5,0%.

#### Especificidad

El método propuesto se comparó con el método PNP utilizando 80 muestras con valores entre 17 y 182 U/L. La comparación resultó en la ecuación de regresión:  $y = 13,4 + 0,307x$  y un coeficiente de correlación (r) igual a 0,96. Es evidente una correlación positiva entre los dos métodos, con una diferencia sistemática 42% al utilizar un nivel de decisión igual a 50 U/L, lo que se explica por la diferencia entre los sustratos y las metodologías utilizadas.

#### Repetitividad

La imprecisión intraensayo se calculó con 20 determinaciones sucesivas de fosfatasa alcalina utilizando dos muestras de suero con diferentes concentraciones.

Los promedios de los coeficientes de variación obtenidos fueron 2,4 y 1,6%.

#### Reproducibilidad

La imprecisión entre ensayos se calculó con 20 determinaciones de fosfatasa alcalina en días diferentes utilizando dos muestras de suero con concentraciones diferentes. Los coeficientes de variación medios obtenidos fueron 2,4 y 2,6%.

#### Sensibilidad Analítica

El límite de detección es igual a 0,125 U/L, equivalente a una absorbancia de 0,001 utilizando como parámetro la absorbancia del Patrón.

#### Efectos de dilución de matriz

Se utilizaron dos muestras con valores de 844 y 1026 U/L para evaluar la respuesta del sistema al evaluar la disminución del tiempo de incubación. Usando tiempos de incubación que oscilan entre 1 y 5 minutos, se encontró recuperaciones entre 95 y 103%.

#### Comparación de métodos

El producto se comparó con otro disponible en el mercado mediante el análisis de 80 muestras de suero humano con valores desconocidos de fosfatasa alcalina. Los resultados analizados por modelos estadísticos demostraron que no existe diferencia significativa a un intervalo de confianza del 95% con un coeficiente de correlación lineal  $r = 0,96$  y una ecuación de regresión  $y = 0,307x + 13,4$ .

#### COMENTARIOS

- La observación cuidadosa de la limpieza y secado de la cristalería, la estabilidad de los reactivos, el pipeteo, la temperatura y el tiempo de reacción es sumamente importante para obtener resultados precisos y exactos.
- Cuando limpie la cristalería, puede usar un detergente neutro o una solución ácida. El último lavado debe hacerse con agua destilada o desionizada.
- El agua utilizada en los laboratorios clínicos debe purificarse utilizando métodos adecuados para los fines de uso. Las columnas desionizantes saturadas liberan varios iones, aminas y agentes oxidantes que deterioran los reactivos.
- La presencia de iones de calcio, fosfato, amonio y borato inhibe la enzima.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Coleman CM, Stroj RC. Clin Chim Acta 1966;13:401
- King EJ. J Path Bact. 1943;55:31.
- Roy AV. Clin Chem 1970;16:431.
- Tonks DB. Quality Control in Clinical Laboratories. Warner-Chilcott Laboratories, Diagnostic Reagents Division, Scarborough, Canada, 1972.
- Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T.1981;27:493-501.
- Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Base de Datos de Variación Biológica. Disponíveis em:<[http://www.seqc.es/ar\\_ticle/ar\\_ticleview/330/1/170](http://www.seqc.es/ar_ticle/ar_ticleview/330/1/170)>(acesso em 04/2006)
- GOLD ANALISA: Informe Técnico do Produto.

#### TÉRMINOS Y CONDICIONES DE LA GARANTÍA DE CALIDAD DEL PRODUCTO Ley N° 8078 del 11/09/90 - Código de Defensa del Consumidor

Gold Analisa garantiza la reposición, sin cargo para el consumidor, de todos los productos que demuestren tener problemas técnicos, siempre que el usuario utilice equipos y materiales en buen estado técnico, siga estrictamente el procedimiento técnico y las recomendaciones establecidas en el Instructivo de Usar.

Número de lote y fecha de caducidad: consulte las etiquetas del producto

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

AF MS No. 800222-3 - Reg. EM - N° 80022230142

Granja. Responder Isabela Fernandes dos Santos - CRF-MG 16773

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

Belo Horizonte MG Brasil CEP: 30710-020

Página de inicio: [www.goldanalisa.com.br](http://www.goldanalisa.com.br)

Correo electrónico: [goldanalisa@goldanalisa.com.br](mailto:goldanalisa@goldanalisa.com.br)

Sector de Atención al Cliente (SAC): 0800 703 1888

Analisa es una marca registrada de Gold Analisa Diagnóstica Ltda.

| SIMBOLOGIA |                                  |  |                                    |
|------------|----------------------------------|--|------------------------------------|
|            | Número de catálogo               |  | Límite de temperatura              |
|            | Número de lote                   |  | Consultar las instrucciones de uso |
|            | Producto de diagnóstico in vitro |  | Fabricado por                      |
|            | Fecha límite de uso              |  |                                    |

Revisión: 05/22