



Alkaline Phosphatase

Finalidade

Método cinético otimizado (DGKC e SSCC) a 405 nm, para a determinação de fosfatase alcalina.

Significado clínico

A fosfatase alcalina é uma enzima amplamente difundida no organismo. Hidrolisa os monoésteres do ácido ortofosfórico em meio alcalino.

No adulto provém em parte do fígado (fração termoestável) e em parte do osso, sistema reticuloendotelial e vascular (fração termolábil), originando diferentes isoenzimas.

A atividade sérica da fosfatase alcalina óssea, em condições normais, alcança sua maior atividade nas crianças em idade do crescimento (chegando a triplicar os níveis do adulto) devido a que a isoenzima encontra-se nos osteoblastos (relacionados com a calcificação e formação das estruturas ósseas). Também é fisiológico o aumento produzido ao final do primeiro trimestre da gravidez, considerando que a isoenzima placentária neste período alcança níveis máximos (aproximadamente o dobro dos valores normais). Nas patologias que afetam a atividade sérica da fosfatase alcalina, pode-se mencionar: carcinomas metastáticos em fígado e em ossos (produtores de enzima), colestase biliar, fenômenos osteoblásticos, transtornos de má-absorção seguida de lesões ulcerosas (onde a deficiência da vitamina D produz osteomalacia com o conseqüente aumento da fosfatase alcalina óssea) e lesões nas vias de restauração tais como enfarte agudo do miocárdio, enfarte pulmonar ou renal.

Fundamentos do método

A fosfatase alcalina (ALP ou monoésteres ortofosfórico fosfohidrolase, EC.3.1.3.1) hidrolisa ao p-nitrofenilfosfato (p-NFF), que não tem cor, produzindo fosfato e p-nitrofenol a pH alcalino. A velocidade da aparição do anião p-nitrofenolato (amarelo) a 405 nm, é proporcional à atividade enzimática da amostra.

Reagentes fornecidos

A. Reagente A: solução de tampão DEA (dietanolamina), contendo sais de magnésio.

B. Reagente B: solução contendo p-nitrofenil fosfato (p-NFF).

Concentrações finais

DEA..... 1,0 mol/L
Mg 0,5 mmol/L
p-NFF 10 mmol/L

Instruções para uso

Reagentes Fornecidos: prontos para uso. Podem-se usar separados ou como Reagente único, misturando 4 partes de **Reagente A** com 1 parte de **Reagente B** (ex: 4 mL Reagente A + 1 mL Reagente B).

Indícios de instabilidade ou deterioração dos reagentes

Quando o espectrofotômetro for zerado com água destilada, leituras de absorvância do Reagente único (pre-misturado) superiores a 0,900 D.O., são indício de deterioração do mesmo.

Precauções

Os reagentes são para uso diagnóstico "in vitro".

Utilizar os reagentes observando as precauções habituais de trabalho no laboratório de análises clínicas.

Todos os reagentes e as amostras devem ser descartadas conforme à regulação local vigente.

Estabilidade e instruções de armazenamento

Reagentes Fornecidos: são estáveis sob refrigeração (2-8°C) até a data de vencimento indicada na embalagem. Uma vez abertos, não devem permanecer destampado nem fora do refrigerador por períodos prolongados. Evitar contaminações.

Reagente único (pré-misturado): é estável um mês sob refrigeração (2-8°C), a partir do momento de sua preparação.

Amostra

Soro ou plasma com heparina

a) Coleta: obter o soro da maneira habitual.

b) Aditivos: se a amostra a utilizar for plasma, recomenda-se o uso de heparina como anticoagulante para sua obtenção.

c) Estabilidade e instruções de armazenamento: empregar soro preferencialmente fresco. Em caso de não efetuado o ensaio dentro das 6 horas posteriores a sua obtenção, a amostra deve ser conservada a -20°C.

Interferências

Não são observadas interferências por bilirrubina até 16 mg/dL, lípidos até 1000 mg/dL de triglicérides, nem heparina até 50 UI/mL.

Hemólise moderada (até 200 mg/dL) não produz interferência, no entanto, hemólise muito severa pode alterar os resultados.

Referência bibliográfica Young à efeitos de drogas no método.

Material necessário (não fornecido)

- Espectrofotômetro.
- Micropipetas e pipetas para medir os volumes indicados.
- Cubetas espectrofotométricas de faces paralelas.
- Banho-maria à temperatura de reação selecionada.
- Cronômetro.

Condições de reação

- Comprimento de onda : 405 nm
- Temperatura de reação: 25, 30 ou 37°C. Vide os "Valores de referência" correspondentes a cada temperatura.
- Tempo de reação: 3 minutos e 20 segundos
- Volume de amostra: 10 uL

Os volumes de amostra e Reagente podem variar-se proporcionalmente, sem que sejam alterados os fatores de cálculo.

Procedimento I

Técnica com reagente único

Numa cubeta mantida à temperatura da reação selecionada colocar:

Reagente único	1,0 mL
Pré-incubar uns minutos. Logo após acrescentar:	
Amostra	10 uL

Misturar rapidamente disparando ao mesmo tempo o cronômetro. Esperar 20 segundos e ler a absorvância inicial. Registrar a absorvância após 1, 2 e 3 minutos da primeira leitura. Determinar a diferença da média de Absorvância/min ($\Delta A/\min$), subtraindo cada leitura da anterior e fazendo a média dos valores. Utilizar esta média para os cálculos.

Cálculos dos resultados

Fosfatase alcalina (U/L) a 405 nm = $\Delta A/\min \times 5460$

Procedimento II

Técnica com reagentes separados

Numa cubeta mantida à temperatura da reação selecionada colocar:

Reagente A	1,0 mL
Amostra	10 uL
Pré-incubar uns minutos. Logo após acrescentar:	
Reagente B	0,25 mL

Misturar rapidamente disparando ao mesmo tempo o cronômetro. Esperar 20 segundos e ler a absorvância inicial. Registrar a absorvância após 1, 2 e 3 minutos da primeira leitura. Determinar a diferença da média de Absorvância/min ($\Delta A/\min$), subtraindo cada leitura da anterior e fazendo a média dos valores. Utilizar esta média para os cálculos.

Cálculos dos resultados

Fosfatase alcalina (U/L) a 405 nm = $\Delta A/\min \times 6812$

Exemplo:

(Os dados apresentados a seguir são ilustrativos)

	Amostra	Diferença	Promédio
Absorvância A1	0,458		
Absorvância A2	0,499	0,041	
Absorvância A3	0,543	0,044	
Absorvância A4	0,586	0,043	0,043

Utilizando Fator teórico (37°C) / Técnica com reagentes separados:

Fosfatase Alcalina (U/L) = $0,043 \times 6812 = 293 \text{ U/L}$

Se é utilizado Laborcal como calibrador:

Concentração de ALP no calibrador: 446 U/L (37°C)

	Calibrador	Diferença	Promédio
Absorvância A1	0,423		
Absorvância A2	0,488	0,065	
Absorvância A3	0,554	0,066	
Absorvância A4	0,619	0,065	0,065

Determinação do fator de calibração:

$$\text{Fator} = \frac{[\text{ALP}]_{\text{calibrador}}}{\Delta A/\min_{\text{calibrador}}} = \frac{446 \text{ U/L}}{0,065} = 6861$$

Fosfatase Alcalina (U/L) = $\Delta A / \text{min}_{\text{amostra}} \times \text{Fator} = 0,043 \times 6861 = 295 \text{ U/L}$

Método de controle de qualidade

Processar 2 níveis de um material de controle de qualidade (**Laborcontrol 1** e **Laborcontrol 2** da Laborlab) com atividades conhecidas de fosfatase alcalina, com cada determinação.

Valores de referência

Em pessoas adultas normais (idades entre 20 e 60 anos) foram observados os seguintes intervalos:

Temperatura	25°C	30°C	37°C
Valores em adultos (U/L)	40-190	45-213	65-300

Devido ao processo osteoclástico, a isoenzima óssea encontra-se aumentada na infância e adolescentes (até os 18 anos, aproximadamente) produzindo valores de fosfatase alcalina mais elevados que nos adultos. Em condições normais consideram-se os seguintes valores limites:

Temperatura	25°C	30°C	37°C
Valores em crianças e adolescentes (U/L)	até 400	até 450	até 645

A IFCC recomenda que cada laboratório estabeleça seus próprios intervalos ou valores de referências escolhendo grupos de pessoas com base de critérios estabelecidos, conforme com o contexto de sua população.

Conversão de unidades ao sistema SI

ALP (U/L) x 0,017 = ALP (ukat/L)

Limitações do procedimento

Vide "Interferências".

Os anticoagulantes comuns, (tais como EDTA dissódico, oxalato, citrato ou fluoreto) produzem inibição da atividade de fosfatase alcalina.

O reagente pode-se corar ainda em presença de pequenas quantidades de soluções de limpeza com base de hipoclorito. Assegure-se de enxaguar com abundante água desmineralizada todo o material que esteja em contato com hipoclorito, incluindo as agulhas e conexões dos analisadores, quando for empregada a técnica automática.

Desempenho

Os ensaios foram realizados em analisador Express Plus® (Ciba Corning Diagnostics).

a) Reprodutibilidade: processando segundo o documento EPSA do CLSI (ex-NCCLS), obteve-se o seguinte:

Precisão intra-ensaio

Nível	D.P.	C.V.
119 U/L	± 2,6 U/L	2,2 %
347 U/L	± 2,6 U/L	0,7 %

Precisão total

Nível	D.P.	C.V.
119 U/L	± 2,9 U/L	2,4 %
347 U/L	± 3,2 U/L	0,9 %

b) Linearidade: a reação é linear até 1.500 U/L. Para valores superiores, repetir a determinação anterior com diluição do soro 1/5 ou 1/10 com solução fisiológica. Corrigir os cálculos multiplicando pelo fator de diluição empregado.

c) Limite de detecção: a mínima mudança de atividade detectável de ALP que pode-se diferenciar de zero é 18 U/L.

Parâmetros para analisadores automáticos

Para a programação consultar o manual de uso do analisador a ser utilizado.

Apresentação

- 2 x 48 mL **Reagente A**
- 2 x 12 mL **Reagente B**
(Cód. 1770110)

Referência

- Bessey, O.A.; Lowry, O.H. y Brock, M. - J. Biol. Chem. 164, 231 (1946).
- Bowers, G.N. Jr. and Mc Comb, R.B. - Clin. Chem. 12:70 (1966).
- Mc Comb, R.B.; Bowers, G.N. Jr - Clin. Chem. 18/2:97 (1972).
- D.G.K.C. - Z. Clin. Chem. u. Klin. Biochem. 8: 658 (1970); 9: 464 (1971); 10: 182 (1972).
- S.S.C.C. - Scand. J. Clin. Lab. Invest. 33/4:291 (1974).
- I.F.C.C. - Clin. Chem. 22/3: 384 (1976).
- International Union of Biochemistry Nomenclature Committee - Clin. Chim. Acta 96/1-2: 157 (1979).
- Young, D.S. - Clin. Chem. 21/5: 246 D (1975).
- I.F.C.C. - Clin. Chim. Acta 87/3: 459F (1978).
- Demaría, I.; Setta, F.; Lorenzo, L. - Rev. Asoc. Bioq. Arg. 54/3 (1990).
- Schlebusch, H.; Rick, W.; Lang, H. and Knedel, M. - Dtsch. Med. Wschr. 99:765 (1974).
- Rick, W. - Klinische Chemie und Mikroskopie, p.294, 6th ed., Springer Verlag, Berlin (1990).
- NCCLS document "Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices", EP5-A (1999).
- NCCLS document "Evaluation of Linearity of Quantitative Analytical Methods", EP5-A (1986).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4th ed., 2001.

SÍMBOLOS



Este produto preenche os requisitos da Diretiva Européia 98/79 CE para dispositivos médicos de diagnóstico "in vitro"



Representante autorizado na Comunidade Européia



Uso médico-diagnóstico "in vitro"



Conteúdo suficiente para <n> testes



Data de validade



Limite de temperatura (conservar a)



Não congelar



Risco biológico



Volume após da reconstituição



Conteúdo



Número de lote



Elaborado por:



Nocivo



Corrosivo / Caústico



Irritante



Consultar as instruções de uso



Calibrador



Controle



Controle Positivo



Controle Negativo



Número de catálogo

Termo de garantia

Este Kit como um todo tem garantia de troca, desde que esteja dentro do prazo de validade e seja comprovado pelo Departamento Técnico da Laborlab Produtos para Laboratórios Ltda. que não houve falhas técnicas na execução e manuseio deste kit, assim como em sua conservação.



Produtos para Laboratórios Ltda.
Estrada do Capão Bonito, 489
Guarulhos - SP - Brasil - CEP: 07263-010
CNPJ: 72.807.043/0001-94
Atendimento ao cliente:
+55 (11) 2480 0529/+55 (11) 2499 1277
sac@laborlab.com.br
www.laborlab.com.br