

FINALIDADE

Sistema cinético para determinação de Fosfatase Alcalina (FALC) no soro ou plasma.

Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO



A Fosfatase Alcalina, em meio alcalino, promove a hidrólise do substrato p-Nitrofenilfosfato liberando p-Nitrofenol.

O substrato é incolor e o radical p-Nitrofenol liberado é amarelado. A intensidade de cor é proporcional à concentração da enzima no soro. A atividade enzimática é determinada pela velocidade de formação do p-Nitrofenol, medida em 405nm.

METODOLOGIA

Cinético, colorimétrico, DGKC.

REAGENTES E APRESENTAÇÃO

Reagentes

Tampão: Dietanolamina 1,25mmol/L. Contém Azida Sódica 0,1%.

Substrato : p-Nitrofenilfosfato 50mmol/L. Contém Azida Sódica 0,1%.

Apresentação

Tampão	5 x 16mL
Substrato	5 x 4mL

NÚMERO DE TESTES

Sistema manual : 100 testes

Sistemas automáticos: 400 testes (aproxim.)

(*) A quantidade de testes na automação é variável de acordo com o equipamento.

Protocolos de automação encontram-se disponíveis no site Doles ou através do Serviço de Atendimento ao Consumidor.

EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

- Espectrofotômetro com leituras em 405nm, cubeta termostaticável, com 10mm de passagem de luz e banda espectral de 8nm ou menos.
- Pipetas graduadas.
- Pipeta semiautomática de 20µL.

- Ponteiras descartáveis.
- Cronômetro.

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Tampão: armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, obedecidas as condições de armazenamento.

Substrato: armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, obedecidas as condições de armazenamento.

Substrato (uso): armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável por 30 dias após o preparo. Evitar exposição à luz.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES COM O USO DOS REAGENTES

Os reagentes são somente para **uso diagnóstico *in vitro***. Seu manuseio deve ser cuidadoso, evitando-se contato com pele e mucosas. Havendo contaminação acidental, lavar a parte afetada em água corrente. O descarte do material utilizado deverá ser feito obedecendo-se aos critérios de biossegurança estabelecidos pelo laboratório, de acordo com as normas locais, estaduais ou federais.

Observar a simbologia constante nos rótulos do produto:



Irritante

AMOSTRA

Soro ou plasma (colhido com heparina). A atividade enzimática mantém-se inalterada por 7 dias à temperatura de 2-8°C e 30 dias a 20°C negativos.

Todas as amostras biológicas devem ser consideradas como potencialmente infectantes.

PROCEDIMENTO TÉCNICO

Opção 01: Transferir todo conteúdo do frasco substrato para o frasco tampão e homogeneizar por inversão. Anotar a data do preparo e vencimento. **O substrato de uso é estável por 30 dias se mantido entre 2-8°C e não havendo contaminação química ou bacteriana.** A presença de turbidez no substrato de uso é um indicativo de contaminação, descartar o reagente.

Opção 02: O substrato de uso pode ser



preparado de acordo com a necessidade. Para tal misturar 04 partes do tampão com 01 parte do substrato.

Realização do teste:

1. Transferir 1mL do substrato de uso para um tubo de ensaio e deixá-lo por alguns minutos à temperatura ambiente.
2. Adicionar 20 μ L da amostra ao substrato de uso e homogeneizar com ligeira agitação.
3. Transferir a solução para a cubeta termostaticada a 37°C (por aspiração em equipamentos dotados de cubeta de fluxo), 405nm.
4. Esperar 01 minuto.
5. Fazer a leitura inicial em absorvância, disparando simultaneamente o cronômetro. Anotar o achado.
6. Repetir as leituras em intervalos de 1, 2 e 3 minutos.
7. Calcular a média das diferenças de absorvâncias por minuto (ΔA /minuto), utilizando-a para calcular o resultado.

CÁLCULO

FOSFATASE ALCALINA U/L = ΔA /minuto x 2764

Exemplo:

Leitura inicial = 0.576

Leitura (1º minuto) = 0.606 $\Delta A = 0.606 - 0.576 = 0.030$

Leitura (2º minuto) = 0.636 $\Delta A = 0.636 - 0.606 = 0.030$

Leitura (3º minuto) = 0.666 $\Delta A = 0.666 - 0.636 = 0.030$

$$\Delta A/\text{minuto} = \frac{\Delta A \text{ 1º minuto} + \Delta A \text{ 2º minuto} + \Delta A \text{ 3º minuto}}{3}$$

$$\Delta A/\text{minuto} = \frac{0.030 + 0.030 + 0.030}{3} = 0,030$$

$$\text{FALC U/L} = 0.030 \times 2764 = 83$$

DETERMINAÇÃO DO FATOR

$$\text{FALC (atividade U/L)} = \frac{\Delta A}{\text{min}} \times \frac{1}{18,45} \times \frac{1,02}{0,02} \times 1000 = \Delta A \times 2764$$

18,45 = absorção molar do 4-Nitrofenol em 405nm.

1,02 = volume total da reação em mL

0,02 = volume de soro em mL

1000 fator / transformação de mililitro em litro.

OBSERVAÇÃO : Os valores encontrados em 37°C podem ser convertidos para 30°C dividindo os mesmos pelo fator 1,24.

LINEARIDADE

A reação é linear até uma concentração, aproximada, de 690 U/L. Para valores maiores diluir a amostra 1:10 com soro fisiológico, repetir a determinação e multiplicar o resultado obtido por 10.

A linearidade do método pode ser comprometido pela linearidade do equipamento utilizado.

LIMITAÇÕES DO SISTEMA

• Para se obter ótimo desempenho do sistema, é necessário que o procedimento técnico seja rigorosamente seguido conforme instruções de uso. Alterações no procedimento técnico podem levar a resultados errôneos.

Não utilizar o Reagente de Trabalho se a leitura de sua absorvância contra água, 405nm, for superior a 1,100.

CONTROLE DA QUALIDADE DO SISTEMA

1. A limpeza e a secagem adequada do material a ser utilizado são de fundamental importância para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.

2. A manutenção dos equipamentos utilizados (pipetas analisadores, etc...) são de fundamental importância para obtenção do desempenho técnico esperado para o produto.

3. As pipetagens devem ser precisas.

4. O uso de soro controle de referência deve ser uma prática rotineira do laboratório. Recomenda-se utilizar um soro controle com valor na faixa de normalidade (**soro controle N - Doles**) e outro soro controle de valor elevado (**soro controle P - Doles**).

5. Utilizar regras de controle apropriadas para verificar a estabilidade do sistema de medição.

VALORES DE REFERÊNCIA

É recomendado que cada laboratório estabeleça sua própria faixa de valores de referência na população atendida.

Como orientação, sugerimos os seguintes valores para 37°C:

Adultos: 100 - 290 U/L

Crianças até 15 anos: 180 - 650 U/L

SIGNIFICADO CLÍNICO

Os níveis de Fosfatase Alcalina sérica são de grande significado na investigação das desordens hepatobiliares e ósseas. Nas enfermidades hepatobiliares, as elevações são encontradas, predominantemente, na obstrução extra-hepática (cálculo vesical, câncer de cabeça do pâncreas). Na obstrução do trato biliar, a atividade da fosfatase alcalina pode estar elevada até dez vezes em relação aos mais altos valores de referência.

O aumento da fosfatase alcalina encontra-se presente em várias enfermidades ósseas, especialmente naquelas que evoluem com quadro de osteólise. A doença de Paget talvez seja, a doença óssea que apresente as maiores atividades de fosfatase alcalina, com níveis 10 a 25 vezes acima dos limites superiores dos valores



de referência.

Discretos aumentos se verificam na osteomalácia, raquitismo, hiperparatireoidismo, fraturas e durante o crescimento ósseo.

Níveis elevados de fosfatase alcalina são encontrados no sarcoma osteogênico.

Discreto ou moderados aumentos podem ser observados durante a gravidez, sendo essa fosfatase de origem placentária.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Foram realizados 40 dosagens em amostras cujos níveis de FALC situavam-se no intervalo de 18U/L a 500U/L. As mesmas feitas em paralelo com um produto comercial de metodologia similar (X) deram origem à seguinte equação de regressão linear: $Y = 1,01X$, sendo o coeficiente de correlação de 0,99.

Repetitividade: foram realizadas 20 dosagens sucessivas, com 2 amostras, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2
Concentração (U/L)	60,2	191,4
Desvio padrão (U/L)	2,53	6,13
Coefficiente de variação (%)	4,20	3,20

Reprodutibilidade: foram realizadas 20 dosagens durante 20 dias consecutivos, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2
Concentração (U/L)	79,7	236,3
Desvio padrão (U/L)	3,28	6,87
Coefficiente de variação (%)	4,11	2,91

Especificidade: a presente metodologia é específica para determinação da Fosfatase alcalina. Soluções proteicas isentas de Fosfatase alcalina quando dosadas pela presente técnica resultaram em leituras de absorvâncias inferiores a 0,002.

Sensibilidade: utilizando-se de um espectrofotômetro de alta resolução, cubetas 10mm de passagem de luz e a 37°C, a variação de 0,001 na absorvância corresponde a 2.76 U/L a 405nm.

Fatores Interferentes

Não utilizar soros hemolisados ou lipêmicos para determinação das fosfatases. O uso de tais amostras pode levar a resultados falsamente elevados.

Podem-se obter resultados errôneos ao não se observarem cuidados com a conservação da amostra e a temperatura de reação.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Kaplan, L.A, Pesce, A.J., Clinical Chemistry, 3ªed, pg. 521-522, 1996.
- Pagana K.D., Pagana T.J., Diagnostic and Laboratory Test Reference, 26-27, 1992.
- Burtis, C.A, Ashwood, E.D., Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2ªed.,830-843, 1994.
- Henry, J.B., *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 277-278, 19ª edição, 1996.
- Bowers, G. N., McComb, R.B. – *Alkaline phosphatase, total activity in human serum in Selected Methods of Clinical Chemistry*, vol. 9, A A .C.C., 1982
- Tibúrcio, H.M.: *Controle interno da qualidade analítica*, 1ªed. março/1995.
- Scandinavian Society for Clinical Chemistry, Committee on Enzymes, Recommended methods for the determination of four enzymes in blood. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 33, 291 (1974).
- German Society for Clinical Chemistry, Standard method for determination of alkaline phosphatase (AP) activity. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 10, 290 (1972).
- Doles: dados de arquivo.

TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

As garantias do fabricante ao consumidor seguem estritamente as relacionadas na Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1.990 - Código de Defesa do Consumidor.

Os reagentes que compõem este sistema para diagnóstico são garantidos na sua performance, reprodutibilidade e qualidade até a data de vencimento.

Os produtos que apresentarem problemas técnicos comprovados serão substituídos, sem ônus para o consumidor.

Doles Reag. Equip. para Laboratórios Ltda.
CNPJ: 01.085.513/0001-05
Rodovia BR 153, Km 493, Lt.07
Chácara Retiro, Conjunto Palmares.
CEP: 74775-027
Goiânia - GO - Brasil
e-mail: doles@doles.com.br

M.S.: nº 10231810078

Revisão: 06 (03/2010)

NBR ISO 9001

**Sistema da Qualidade
certificado desde 1999**