

Método
Cinético (IFCC).

Finalidade

Sistema para a determinação quantitativa da atividade da Fosfatase Alcalina no soro ou plasma, por reação cinética. **Somente para uso diagnóstico in vitro.**

Princípio

A fosfatase alcalina presente no soro hidrolisa em meio alcalino o p-nitrofenilfosfato liberando p-nitrofenol e fosfato inorgânico.

A reação ocorre de acordo com a seguinte reação:

FALC



A quantidade de p-nitrofenol formada é diretamente proporcional à atividade enzimática da fosfatase alcalina presente na amostra e é medida em 405 nm.

Significado Clínico

O fracionamento das isoenzimas da fosfatase alcalina é útil para diferenciar doenças ósseas de doenças hepáticas, sendo que são várias as fontes produtoras. As isoenzimas da fosfatase alcalina são diferenciadas pelo teste de estabilidade ao calor. A isoenzima de origem hepática (ALP1) é termoestável, enquanto que a fração óssea (ALP2) é inativada pelo calor. Sendo assim facilitando o diagnóstico de doenças do fígado e dos ossos. A fosfatase alcalina está aumentada nas doenças hepáticas e do trato biliar, na acromegalia, no hipertireoidismo, na metástase do fígado e metástase óssea, no raquitismo, na mononucleose infecciosa e na doença de Paget. Observou-se que quando da sua elevação paralelamente ocorre a elevação da bilirrubina sérica. Valores diminuídos da fosfatase alcalina podem ser observados no hipotireoidismo, retardamento de crescimento nas crianças, hipofosfatasia e em casos de desnutrição grave.

Reagentes

Reagente nº 1 - Tampão - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Tampão Fosfato (pH 10,4) 2,0 mol/L, Sulfato de Zinco 1,2 mmol/L, Acetato de Magnésio 2,5 mmol/L, Azida 0,7 mmol/L.

Reagente nº 2 - Substrato - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: 4-Nitrofenilfosfato >100 mmol/L, Azida Sódica ≤0,15 mmol/L. (pH 10,4).

Estabilidade, Condições de Armazenamento e Transporte

Os reagentes são estáveis até a data de validade impressa no rótulo do produto, quando conservados na temperatura recomendada (2 a 8°C), bem vedados e se evitado de contaminação durante o uso. Antes de serem abertos, os reagentes podem ser transportados em temperatura que não excede 30°C, até um limite de 120 horas. **Não congelar.**

Cuidados Especiais e Precauções

- As amostras a serem analisadas devem ser tratadas como material potencialmente infectante.
- Utilizar os EPI's de acordo com as Boas Práticas de Laboratório Clínico.
- O Tampão (1) e o Substrato (2) contêm azida sódica que é tóxica e irritante para pele e mucosa.
- As informações de Descarte, Segurança e Primeiros Socorros estão descritas na Ficha Individual de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) deste produto, disponível em www.bioanalitica.com.br ou pelo telefone 0800 006 8111.
- Reagentes de lotes diferentes não devem ser misturados.
- Não trocar as tampas dos frascos dos reagentes, a fim de evitar contaminação cruzada.
- Não utilizar os reagentes quando se apresentarem turvos.
- Evitar deixar os reagentes fora das condições de armazenamento especificadas, quando os mesmos não estiverem em uso.
- O tempo de reação, pipetagens e temperatura de trabalho são muito importantes para obtenção de resultados corretos.
- Usar pipetas de vidro e ponteiras descartáveis específicas para cada amostra, controle, padrão/calibrador e reagente.

Materiais Necessários e Não Fornecidos

- Analizador bioquímico automático, semiautomático;
- Pipetas de vidro e/ou automáticas;
- Ponteiras;
- Tubos de ensaio;
- Cronômetro.

Amostra

Soro ou plasma (Heparina). O analito é estável por 7 dias entre 2 - 8°C, quando livres de contaminação.

Interferências e Limitações

Hemólise acentuada apresenta resultado falsamente diminuído. Glicose e glicerol aumentam a atividade da enzima, atuando como coletores 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.

Concentrações triglicírides até 944 mg/dL e hemoglobina até 433 mg/dL não produzem interferências significativas. Valores de bilirrubina maior que 12,70 mg/dL e ácido ascórbico maior que 4,0 mg/dL produzem interferências significativas nas amostras.

Procedimento Técnico

Preparo do Reagente de Trabalho

Misturar 9 partes do Tampão (1) com 1 parte do Substrato (2). O reagente é estável por 14 dias armazenado entre 2 e 8°C. Proteger da luz.

Equipamentos Automáticos

Para uso em analisadores automáticos, verificar o protocolo de automação no site www.bioanalitica.com.br ou através do SAC.

Nota: Recomendamos o uso do Calibrador – Ref. BA052 para calibração. Para avaliar a precisão das dosagens, recomendamos o uso do Controle N – Ref. BA115 e Controle P – Ref. BA118.

Condições de Reação:

Cubeta termostatizada a 37°C com caminho ótico de 1 cm de espessura de solução. Comprimento de onda 405 nm. Banda de passagem ≤8 nm. Luz espúria ≤ 0,1%.

Procedimento do Teste

Adicionar 20 µL de amostra a 1,0 mL de Reagente de Trabalho, misturar e transferir para cubeta termostatizada a 37°C e esperar 1 minuto. Fazer a leitura inicial A_0 , disparando simultaneamente o cronômetro. Efetuar novas leituras após 1, 2 e 3 minutos (A_1 , A_2 e A_3). Calcular a média das diferenças de absorbância por minuto ($\Delta A/\text{minuto}$). Utilizar este valor para cálculo do resultado. As diferenças entre as absorbâncias ($\Delta A/\text{minuto}$) devem ser praticamente iguais, indicando a linearidade do método. O mesmo procedimento deve ser feito para o calibrador. Recomendamos o uso de Calibrador – Ref. BA052 da Bioanalítica.

Cálculos

$\text{ALP (U/L)} = \Delta A/\text{min.} \times 2757$ Os resultados serão expressos em U/L.

Quando se é possível trabalhar sob as condições de reação descrita, usa-se o fator teórico de calibração: 2757.

Nem sempre é possível trabalhar sob essas condições, por isso recomendamos a utilização do Calibrador – Ref. BA052.

Características do Desempenho

Comparação de Métodos

O método foi comparado com outro produto com metodologia semelhante através de 40 amostras de soro humano. Através de modelos estatísticos, os resultados foram analisados e resultaram na equação de regressão linear onde Método Bioanalítica (y) = 55,575 + 0,786 * Método comparativo (x) e coeficiente de correlação igual a 0,991.

Sensibilidade

Uma amostra proteica não contendo Fosfatase Alcalina, foi utilizada para calcular o limite de detecção do ensaio. A média encontrada foi 1,6900 U/L equivalente a 20 determinações, com desvio padrão de 0,6000 U/L. A sensibilidade, que indica o limite de detecção do método, corresponde à média mais 3 vezes o desvio padrão, que é igual a 3,50 U/L.

Linearidade

A reação é linear até 1000 U/L. Para amostras com valores acima de 1000 U/L, diluir a amostra com Cloreto de Sódio 0,85%, repetir a dosagem e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

Repetitividade

A repetitividade foi calculada a partir de 20 determinações sucessivas, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração Média (U/L)	15,04	54,99	183,06
Desvio Padrão (U/L)	0,38	0,24	3,64
Coeficiente de Variação (%)	2,55	0,44	1,99

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi calculada a partir de 20 determinações sucessivas durante 20 dias consecutivos, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração Média (U/L)	15,01	63,05	198,63
Desvio Padrão (U/L)	0,43	3,39	5,88
Coeficiente de Variação (%)	2,86	5,37	2,96

Valores de Referência

Estes valores de referência devem ser usados apenas como orientação. Sugere-se que cada laboratório estabeleça seus próprios valores para população atendida. Os resultados dos testes devem ser analisados por um profissional responsável.

Adultos	27 – 100 U/L
Crianças e Adolescentes até 16 anos	75 – 390 U/L

Unidade convencional (U/L) x 0,0167 = Unidade SI (μ Kat/L).

Controle Interno da Qualidade

O laboratório clínico deve possuir um programa interno de controle da qualidade, para assegurar que todos os procedimentos, normas, limites e tolerância para variações sejam claramente definidos. Ressaltamos que todos os sistemas de medição apresentam uma variabilidade analítica, que deve ser monitorada pelos laboratórios. Portanto, é recomendável a utilização de controles, que permitem avaliar a precisão e a exatidão das dosagens. Sugere-se utilizar soluções estabilizadas da linha de controles e calibradores da Bioanalítica.

Observações

- A limpeza e secagem adequadas do material usado são fatores fundamentais para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
- A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de agentes contaminantes. A limpeza da vidraria deve ser feita com detergente neutro. O enxágue deve ser exaustivo sendo os últimos com água destilada ou deionizada.
- A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes e usar nas medições, a água deve ser do Tipo II, com resistividade > 1 megaohms/cm ou condutividade < 1 microsiemens/cm e concentração de silicatos $< 0,1$ mg/L. Para o enxágue inicial da vidraria, a água pode ser do Tipo III, com resistividade $> 0,1$ megahoms ou condutividade < 10 microsiemens. No enxágue final, utilizar água do Tipo II. Coluna deionizadora com sua capacidade saturada libera água alcalina, vários íons e também substâncias com grande poder de oxidação ou redução que deterioram os reagentes em poucos dias ou mesmo horas, alterando de maneira imprevisível os resultados. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle da qualidade da água.

Referências Bibliográficas

- 1 - Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T. Clin. Chem. 1981; 27: 493-501.
- 2 - IFCC Methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes- Part 5, IFCC method for Alkaline Phosphatase. J Clin Chem Clin Biochem 1983; 21:731-47.
- 3 - Gardner, M. D. et al – Frequency distribution and reference values of plasma alkaline phosphatase (EC3.1.3.1) activity in the adult population of Scottish new town – J. Clin. Pathol. 31/12:1202 (1978).
- 4 - Kaplan A, Szabo LL, Opheim KE. Clinical Chemistry: Interpretation and Techniques. Philadelphia: Lea & Febiger 1988:190-191.
- 5 - Scand J Clin Lab Invest 1974; 33: 291-306.
- 6 - Deutschen Gesellschaft fur Klinische Chmie. Z Klin Chem Klin Biochem 1970; 8:658-660.
- 7 - Bioanalítica: Dados internos de arquivo do P&D.

Termos e Condições de Garantia

A Bioanalítica Diagnóstica garante o desempenho e a qualidade deste produto, dentro das especificações, até a data de expiração indicada nos rótulos, desde que utilizados, armazenados e transportados nas condições adequadas.

Apresentações

Ref.	Volume	Reagente 1	Reagente 2
BA223-60	60 mL	1 x 54 mL	1 x 6 mL
BA223-120	120 mL	2 x 54 mL	2 x 6 mL

Bioanalítica Diagnóstica S/A.

Rua Álvares da Silva, 12 - União
CEP: 31160-360 – Belo Horizonte MG - Brasil
Tel. +55 31 3657-0051
www.bioanalitica.com.br
E-mail: bioanalitica@bioanalitica.com.br
CNPJ: 20.264.948/0001-61 – Indústria Brasileira
SAC: 0800 006 8111
E-mail: sac@bioanalitica.com.br

Revisão: Junho / 2022.