

Fosfatase Alcalina Ceba – Cinética

Método

4-nitrofenilfosfato – Tampão AMP (IFCC) - Cinético

Finalidade

Kit para determinação da fosfatase alcalina em amostras de soro ou plasma.

Princípio do método

A fosfatase alcalina, em meio alcalino, catalisa a transferência do grupo fosfato do 4-nitrofenilfosfato ao 2-amino-2metil-1-propanol (AMP), liberando 4-nitrofenol. A concentração catalítica é determinada a partir da velocidade de formação do 4-nitrofenol, medido em 405 nm, sendo diretamente proporcional a atividade enzimática da amostra.

Reagentes fornecidos

1. Tampão: 2-amino-2metil-1-propanol 0,35 mmol/L, acetato de magnésio 2 mmol/L, sulfato de zinco 1 mmol/L, ácido N-hidroxietilendiaminotriacético 2mmol/L, pH 10,4 (1 X 80 mL).
2. Substrato: 4-nitrofenilfosfato 12 mmol/L, (1 X 20 mL).

Condições de uso e armazenagem

A data de validade aparece no rótulo da embalagem. Não usar reagentes cuja data de validade tenha expirado.

Todos os reagentes devem ser mantidos sob refrigeração na faixa de 2 a 8°C. Manter ao abrigo da luz. Os reagentes devem permanecer fora do refrigerador somente o tempo necessário para as dosagens.

Insumos e equipamentos necessários não fornecidos

- Água destilada ou deionizada
- Banho-maria
- Cronômetro
- Espectrofotômetro
- Pipetas manuais ou automáticas
- Ponteiras descartáveis
- Vidraria

Precauções e cuidados especiais

- Somente para uso diagnóstico “in vitro”.
- Não misturar ou trocar lotes de reagentes diferentes.
- Evitar contaminação microbiana dos reagentes e não utilizar reagentes que tenham sinais de contaminação ou precipitação.
- Caso haja contato com quaisquer reagentes lavar a área afetada com água em profusão. Em caso de ingestão de reagentes procurar auxílio médico imediato munidos desta instruções de uso.
- Utilizar equipamentos de proteção individual segundo normas de biossegurança.
- A água (destilada ou deionizada) utilizada na limpeza do material ou nos procedimentos deve ser recente e isenta de agentes contaminantes.
- Certificar-se das condições adequadas de funcionamento dos equipamentos de análise.
- O descarte do material utilizado deve ser feito segundo os critérios de biossegurança.
- Lavar as mãos após trabalhar com material potencialmente infeccioso.

Amostra biológica

- Soro ou plasma.

A fosfatase alcalina em soro ou plasma é estável durante 7 dias quando mantida entre 2 e 8°C. Utilizar apenas heparina como anticoagulante.

Todo o material biológico deve ser processado como sendo potencialmente contaminante. Usar luvas descartáveis durante a manipulação do material biológico. As amostras devem ser descartadas, após o uso, em recipientes específicos para este fim. Não dispensar em coletores de lixo comuns ou nas redes de água e esgoto.

Procedimento

Ler, cuidadosamente, as instruções desta bula.

Preparo dos reagentes:

Verter o conteúdo do frasco do Reagente nº 2 (Substrato) no frasco de Reagente nº 1 (Tampão) e homogeneizar bem. É recomendável a transferência de parte do homogeneizado para o frasco de Reagente nº 2 (Substrato), com o objetivo de se obter a diluição completa do reagente contido no mesmo; após homogeneizar, verter novamente o conteúdo no frasco de Reagente nº 1 (Tampão). Rotular como Reagente de Trabalho. Este reagente é estável, sob refrigeração, na faixa de 2 a 8°C, durante 2 meses, se mantido fora do refrigerador somente o tempo necessário para as dosagens.

Obs.: podem ser preparados volumes menores de reagente de trabalho, desde que respeitada a proporção de 1mL de Substrato + 4mL de Tampão.

Dosagem em soro ou plasma:

1. Permitir que reagentes e amostras atinjam a temperatura ambiente;
2. Pré-aquecer o espectrofotômetro e o reagente de trabalho a 37°C;
3. Acertar o zero do espectrofotômetro utilizando água destilada ou deionizada;
4. Pipetar em uma cubeta termostatzada a 37°C como a seguir:

Método	Micro	Macro
Amostra	10µL	20 µL
Reagente de trabalho	0,5mL	1,0mL

5. Homogeneizar rapidamente e inserir em um porta-cubetas termostatzado a 37°C;
6. Ler e registrar a absorbância inicial (A_0), em 405 nm e acionar o cronômetro;
7. Realizar novas leituras (A_1 , A_2 e A_3), em intervalos de 1 minuto durante 3 minutos;
8. Comprovar que as diferenças entre as absorbâncias sejam sensivelmente iguais. Calcular a média das diferenças das absorbâncias (DA/min), que será usada nos procedimentos de cálculo.

$$DA/min = \frac{(A_1 - A_0) + (A_2 - A_1) + (A_3 - A_2)}{3}$$

Cálculos

Considerando que o coeficiente de absorção molar do NADH é 6300 em 340 nm, se deduzem as seguintes fórmulas para calcular a concentração catalítica.

- $DA/min \times 2764 = U/L$

Unidades SI: $DA/min \times 46,08 = \mu Kat/L$

Linearidade

A reação é linear até 1200 U/L (20 $\mu Kat/L$). Para valores acima de 1200 U/L, diluir a amostra com solução de NaCl 0,85% e repetir a dosagem. Multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

Valores de referência

- Soro ou Plasma

Homens: até 115 U/L* - Mulheres: até 105 U/L*

Valores Pediátricos (U/L): 7meses – 12 meses: <1107 * • 2-3 anos:<673 * • 4-6 anos :<673 * • 7 - 12 anos de idade < 448 *

*Estes valores são dados apenas a título orientativo. É recomendável que cada laboratório estabeleça sua própria faixa de valores de referência.

Controle de qualidade

O laboratório deve ter como prática de rotina o uso de soros controle comerciais. Preferencialmente deve participar de programas de controle externo de qualidade, a exemplo daqueles oferecidos pela SBAC e SBPC.

Dados estatísticos de desempenho do teste

Recuperação: 98,7%.

Coeficiente de variação intra-ensaio (repetitividade): A realização de 20 determinações de uma mesma amostra com valor dentro da faixa de referência, mostrou um coeficiente de variação igual a 2,77%. O mesmo procedimento para valores elevados mostrou um coeficiente de variação igual a 2,60%.

Coeficiente de variação inter-ensaio (reprodutibilidade): A realização de 20 determinações de uma mesma amostra com valor dentro da faixa de referência, mostrou um coeficiente de variação igual a 4,55%. O mesmo procedimento para valores elevados mostrou um coeficiente de variação igual a 3,70%.

Especificidade analítica: A comparação com método similar validado (que também utiliza a metodologia cinética com p-nitrofenilfosfato de sódio) demonstrou um coeficiente de correlação, igual a 0,992 a partir da análise de amostras aleatórias oriundas de pacientes de ambulatório. A equação de regressão obtida foi: $y = 1,055x + 1,67$

Sensibilidade analítica: O método apresenta uma variação de absorbância em 405 nm igual a 0,00037 em cada acréscimo de 1U/L na concentração de fosfatase alcalina. O limite de detecção do método é igual a 15 U/L.

Interferentes

Anticoagulantes, tais como fluoreto, oxalato, citrato e EDTA interferem. A hemólise interfere devido à presença de fosfatase alcalina eritrocitária.

Referências bibliográficas

1. BERGMEYER, H.U (Ed.) Methods of Enzymatic Analysis, Academic Press, p.75-8
2. BRETAUDIERE, J.P. VASSAULT, A., Amsellem, L. et al. Clin. Chem. 23: 2263, 97
3. REJ, R. Clin. Chem. 23: 1903, 1977.

Apresentação

Número de testes Macro: 100

Número de testes Micro: 200

Automação

Os reativos podem ser utilizados em analisadores automáticos. Vide programação no verso ou solicite informações ao seu distribuidor.

Dados do fabricante

MBiolog Diagnósticos Ltda

Rua Gama, 337 – Vila Paris – Contagem – MG – CEP 32372-120

Resp. Técnico: Fabrício Galvão de Brito – CRF-MG 9587

SAC - Serviço de Atendimento ao Cliente

☎ (31) 3507-0707

✉ sac@mbiolog.com.br

COBAS MIRA/ PLUS®	
GENERAL	
MEASUREMENT MODE	ABSORB
REACTION MODE	R-S - 1
CALIBRATION MODE	FACTOR-1
REAGENT BLANK	REAG/DIL - 2
CLEANER	NO - 1
WAVELENGTH	405 nm - 2
DECIMAL POSITION	0 (U/L)
UNIT	21 (U/L)
ANALYSIS	
POST. DIL FACTOR	2
CONC. FACTOR	NO - SPACE
SAMPLE CYCLE	1
VOLUME	4 µL
DILUTION NAME	H2O - 0
VOLUME	20 µL
REAGENT CYCLE	1
VOLUME	200 µL
CALCULATION	
SAMPLE LIMIT	NO - SPACE
REACTION DIRECTION	INCREASE - 1
CHECK	ON - 1
CONVERSION FACTOR	1
OFFSET / TEST RANGE LOW	0 / 0
HIGH	690 U/L
NORMAL RANGE LOW	0
HIGH	115
NUMBER OF STEPS	
CALCULATION STEP A	KINSEARCH - 1
READING FIRST	3
LAST	8
CALIBRATION	
CALIBRATION INTERVAL	ON REOUEST - 3
TIME	NO - SPACE
REAGENTE RANGE LOW	NO - SPACE
HIGH	NO - SPACE
BLANK RANGE LOW	-0,20 DA
HIGH	0,20 DA
FACTOR	5059
Utilizar calibrador ou soro controle para verificar os parâmetros da programação e, se necessário, para ajuste do fator	

EXPRESS 550/PLUS®			
TEST NAME: FAL		TEST: FAL	
TEST BAR CODE: IPU*			
TEST TYPE: KINETC		CURVE TYPE:: BLAN. LINEAR	
UNITS: U/L		Nº OF DECIMAL PLACE: 0	
PRIMARY WAVELENGHT:405		SECONDARY WAVELENGHT: -	
READ TIME / INTERVAL: 30		SAMPLE BLANK: NO	
FACTOR: -3177			
CALIBRATION INTERVAL: 180 h		Nº OF REPLICATES: 2	
Nº OF CALIBRATOR: IPU*			
LOW BLANK A LIMIT: -0.100		HIGH BLANK A LIMIT: 0.650	
LOW A LIMIT: -0.200		HIGH A LIMIT: 2.000	
LOW NORMAL: 0		HIGH NORMAL: 115	
LINEARITY LIMIT: 690		CURVE S.D. LIMIT: 8	
SAMPLE VOLUME: 6 µL		TEST: FAL	
SAMPLE DILUENTE BOTTLE TYPE: *		PREDILUTION RATIO: 1	
REAGENT DILUENTE BOTTLE TYPE:*			
REAGENT DILUENT:	VOL. RAG.	BD DIL	LAG TIME BT
REAGENT 1:	300		40 *
IPU: Inserido Pelo Usuário			
*: Entre com o tipo de frasco utilizado. Plástico ou Vidro			
Utilizar calibrador ou soro controle para verificar os parâmetros da programação e , se necessário, para ajuste do fator			

BIO 2000 & LABQUEST®			
MODO	CIN	INT. CIN	60
WLI	405	Nº DE INTERV	3
WL2		DA LIMIT	0,2
TEMP?	37°C	% LIM LIN	20
VOL ASP	400	DIR	INC
RETARDO	30	ABS REAT MIN	0,3
FATOR	2764	ABS REAT MIN	1,8
UNDIDAD	U/L	VR/VN MIN	0
DECIMALS	0	VR/VN MAX	115
IMPRESSÃO	EXT		
Utilizar calibrador ou soro controle para verificar os parâmetros da programação e, se necessário, para ajuste do fator			

RA-50®	
TEMPERATURA	37 °C
VOLUME DA AMOSTRA	20
VOLUME DO REAGENTE	1000
FATOR	2764
VALOR NORMAL	0 - 115
MODELO DE REACÃO	CINÉTICA ENZIMÁTICO
UNIDADES	U/L
COMPRIMENTO DE ONDA	405 nm
INTERVALO DE TEMPO	60
ESTABILIZAÇÃO	10
NÚMERO DE LEITURAS	3
INCLINAÇÃO DA REAÇÃO	CRESCENTE
LINEARIDADE	1200 U/L
PRECISÃO DO RESULTADO	1
VOLUME DE ASPIRAÇÃO	800
Utilizar calibrador ou soro controle para verificar os parâmetros da programação e, se necessário, para ajuste do fator	
RA-100®	
TEST N° / TEST NAME	FAL
UNITS	U/L
LOW NORMAL	26
HIGH NORMAL	117
FACTOR	3410
STAND. CON	-
TYPE	2
WAVELENGTH	405
SAMPLE VOLUME	5
SAMPLE PRIME VOL.	5
SAMPLE FLUSH VOL.	250
REAGENT. VOL	250
REAG. PRIME VOL.	12,5
REAG. FLUSH VOL.	250
INCUBATION TIME	70
REAG. ABS LOW	0.05
REAG. ABS HIGH	0,7
REACT. ABS LOW	0,1
REACT. ABS HIGH	2
MAX LIN RSLT	1200
TEMPERATURA	37°C
IPU* Inserido Pelo Usuário	
Utilizar calibrador ou soro controle para verificar os parâmetros da programação e, se necessário, para ajuste do fator	

BTS-310®		
LOCALIDAD	IPU*	
NOMBRE TECNICA	FAL	
UNIDADES	4	
MODO DE CÁLCULO	CDF	
MODO DE LECTURA	-	
FILTRO REFERENCIA	-	
FILTRO LECTURA	405	
FATOR	2764	
TIEMPO ESTBILIDAD	1	
TIEMPO INCUBACION	20	
TIEMPO INTERVALO	60	
NÚMERO DE INTERVALOS	3	
VOLUME DE ASPIRAÇÃO	800	
TIPO DE REACION	C	
ESTANDAR	-	
N° ESTANDARTES	-	
DUP. ESTANDARTES	-	
DUP. MUESTRAS	-	
ESCALAS ABS	-	
CONC.	-	
FACTOR DILUCION	-	
TEMPERATURA	37	

ABBOT VP®		
NAME INDEX – TES NAME	18 (FAL)	
TEMPERATURE	37°C	
FILTER ID CODE	51 (415/450)	
UNITS	11(U/L)	
DILUTION 1:	101 (1:101)	
REV. TIME	2	
AUX. DISP	NO	
FRR	YES	
REACTION UP	YES	
STANDARD	NO	
REAG. BLANK	YES	
ASSAY FACTOR	5050	
END. POINT	NO	
BGN PRT REVOVUTION	3	
PRT REVOLUTION	1	
INITIAL REAGENT AD	0,5	
UP LIMIT	YES	
MAX ABSB LIMIT	1	
SUB. DEPL / REAF. DEGRADATION	02	40

Todos os equipamentos são marcas registradas de seus fabricantes