

Fosfatase Alcalina Cepa – 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-2metyl-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

- Tampão: 2-amino-2metyl-1-propanol 0,35 mmol/L, acetato de magnésio 2 mmol/L, sulfato de zinco 1 mmol/L, ácido N-hidroxietilenodiaminotriacético 2mmol/L, pH 10,4 (1 X 80 mL).
- Substrato:4-nitrofenilfosfato12 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
- Vidria

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.

- 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.

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 uma 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:

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

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

- Homogeneizar rapidamente e inserir em um porta-cubetas termostatizado a 37°C;
- Ler e registrar a absorbância inicial (A_0), em 405 nm e acionar o cronômetro;
- Realizar novas leituras (A_1 , A_2 e A_3), em intervalos de 1 minuto durante 3 minutos;
- 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.

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

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.

- $\text{DA/min} \times 2764 = \text{U/L}$

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

Linearidade

A reação é linear até 1200 U/L (20 µKat/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

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

- BERGMEYER, H.U (Ed.) Methods of Enzymatic Analysis, Academic Press, p.75-8
- BRETAUDIERE,J.P.VASSAULT, A., Amsellem, L. et al. Clin. Chem. 23: 2263, 97
- 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 REQUEST - 3 |
| TIME | NO - SPACE |
| REAGENTE RANGE LOW | NO - SPACE |
| | HIGH NO - SPACE |
| BLANK RANGE LOW | -0,20 DA |
| | HIGH 0,20 DA |
| FACTOR | 5059 |
| <i>Utilizar calibrador ou soro controle para verificar os parâmetros da programação e, se necessário, para ajuste do fator</i> | |

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 | |
| <i>*: Entre com o tipo de frasco utilizado. Plástico ou Vidro</i> | |

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 REAÇÃO | 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 Nº / 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 | - |
| Nº 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 REVOLUTION | 3 |
| PRT REVOLUTION | 1 |
| INITIAL REAGENT AD | 0,5 |
| UP LIMIT | YES |
| MAX ABSB LIMIT | 1 |
| SUB. DEPL / REAF. DEGRADATION | 02 |
| | 40 |

Utilizar calibrador ou soro controle para verificar os parâmetros da programação e, se necessário, para ajuste do fator

Todos os equipamentos são marcas registradas de seus fabricantes