



ALP 405

cinética otimizada

Para a determinação de fosfatase alcalina. DGKC e SSCC

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) visto que se encontra 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, podem ser mencionadas: carcinomas metastásicos 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 consequente 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 9,8. A velocidade da aparição do ânion p-nitrofenolato (amarelo) a 405 nm, é proporcional à atividade enzimática da amostra. A dietanolamina (DEA), regula o pH da reação e atua como aceitador do fosfato liberado pela fosfatase (transfosforilação), observando-se como resultado uma aceleração da reação. A DEA reúne as melhores condições na aceleração e capacidade de tamponar quando é utilizado p-NFF como substrato; por essa razão, a DGKC e a SSCC selecionarão a dietanolamina para o desenvolvimento de seus métodos otimizados.

REAGENTES FORNECIDOS

A. Reagente A: comprimidos para determinações individuais. Cada comprimido tem p-NFF para determinar uma concentração final de 10 mmol/l.

B. Reagente B: solução de dietanolamina 1 mol/l, pH 9,8 (a 25°C), contendo sais de magnésio 0,5 mmol/l.

INSTRUÇÕES PARA USO

Reagente A: dissolver um comprimido de Reagente A com

2,5 ml de Reagente B. Agitar até a dissolução completa.

Reagente B: pronto para uso. Tampar imediatamente depois de usar.

INDÍCIOS DE INSTABILIDADE OU DETERIORAMENTO DOS REAGENTES

Quando o espectrofotômetro for zerado com água destilada, leituras de absorbância do Reagente A reconstituído superiores a 0,700 D.O., são indicio de deterioramento 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 descartados conforme a regulação local vigente.

ESTABILIDADE E INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Reagentes Fornecidos: são estáveis sob refrigeração (2-10°C) até a data de vencimento indicada na embalagem.

Reagente A reconstituído: é estável uma semana sob refrigeração (2-10°C), a partir do momento de sua reconstituição.

AMOSTRA

Soro

a) Coleta: obter o soro da maneira habitual.

b) Aditivos: não requeridos.

c) Substâncias interferentes conhecidas:

- Hemólises visíveis e intensas podem ser causas de ligeiras variações nos resultados.

- Os anticoagulantes comuns, (tais como EDTA dissódico, oxalato, citrato ou fluoreto) produzem entre 50 e 90% de inibição da atividade de fosfatase alcalina.

- Existem drogas que podem alterar os níveis séricos de fosfatase alcalina, motivo pelo qual é conveniente interrogar o paciente a respeito dos medicamentos que está utilizando.

Referência bibliográfica de Young para efeitos de drogas neste método.

d) Estabilidade e instruções de armazenamento: empregar soro preferencialmente fresco. Caso o ensaio não seja efetuado dentro das 6 horas após a coleta, a amostra deve ser congelada (-20°C).

Se o soro for mantido a temperatura ambiente ou sob refrigeração (2-10°C), pode ser observado aumento da atividade da fosfatase alcalina de 5 a 30% em 24 horas.

MATERIAL NECESSÁRIO (não fornecido)

- Espectrofotômetro.
- Micropipetas e pipetas capazes de 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. A temperatura deve ser selecionada conforme o aparelho utilizado.
- Tempo de reação: 3 minutos
- Volume de amostra: 20 ul
- Volume de Reagente A (Substrato): 2,5 ml
- Volume final da reação: 2,52 ml

Os volumes de amostra e Reagente A podem variar proporcionalmente, mantendo a relação 1:125.

PROCEDIMENTO

Em uma cubeta mantida à temperatura da reação selecionada colocar:

Reagente A reconstituído	2,5 ml
---------------------------------	--------

Pré-incubar uns minutos. Logo após acrescentar:

Amostra	20 ul
----------------	-------

Misturar rapidamente. Ler a absorbância inicial e ativar simultaneamente o cronômetro. Tomar nota da absorbância logo de 1, 2 e 3 minutos da primeira leitura. Determinar a diferença da média de Absorbância/min ($\Delta A/\text{min}$), 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 = $\Delta A/\text{min} \times 6.812$

MÉTODO DE CONTROLE DE QUALIDADE

Processar 2 níveis de um material de controle de qualidade (**Standatrol S-E 2 níveis**) 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 adolescência (até os 18 anos, aproximadamente) produzindo valores de fosfatase alcalina mais elevados que nos adultos. Em condições normais são considerados 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 Substâncias interferentes conhecidas em AMOSTRA.

PERFORMANCE

a) Reprodutibilidade: processando réplicas das mesmas amostras em um mesmo dia, foram obtidos os seguintes dados:

Nível	D.P.	C.V.
296 U/l	$\pm 9,15$ U/l	3,1 %
923 U/l	$\pm 14,6$ U/l	1,6 %

b) Linearidade: a reação é linear até 1.360 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: depende do fotômetro utilizado. De acordo com a sensibilidade requerida, em espectrofotômetro a 405 nm (com cubetas de faces paralelas de 1 cm de espessura, reprodutibilidade ± 2 nm, luz espúria $\leq 0,5\%$, banda de passagem ≤ 8 nm) para um $\Delta A/\text{min}$ de 0,001 a menor alteração detectável será de 7 U/l.

APRESENTAÇÃO






















- 50 determinações (50 x 2,5 ml) (Cód. 1361401).

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. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4th ed., 2001.
- I.F.C.C. - Clin. Chim. Acta 87/3: 459F (1978).
- Demaría, I.; Setta, F.; Lorenzo, L. - Rev. Asoc. Bioq. Arg. 54/3 (1990).

Símbolos

Os seguintes símbolos são utilizados nos kits de reagentes para diagnóstico da Wiener lab.

	Este produto preenche os requisitos da Diretiva Europeia 98/79 CE para dispositivos médicos de diagnóstico "in vitro"		Elaborado por:
	Representante autorizado na Comunidade Europeia		Nocivo
	Uso médico-diagnóstico "in vitro"		Corrosivo / Caústico
	Conteúdo suficiente para <n> testes		Irritante
	Data de validade		Consultar as instruções de uso
	Limite de temperatura (conservar a)		Calibrador
	Não congelar		Controle
	Risco biológico		Controle Positivo
	Volume após a reconstituição		Controle Negativo
	Conteúdo		Número de catálogo
	Número de lote		

 **Wiener lab.**

2000 Rosario - Argentina