



# Alkaline Phosphatase

## Finalidade

Método cinético otimizado (DGKC e SSCC) a 405 nm, para a determinação de fosfatase alcalina.

## 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) devido a que a isoenzima encontra-se 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, pode-se mencionar: carcinomas metastáticos no fígado e ossos (produtores de enzima), colestase biliar, fenômenos osteoblásticos, transtornos de má absorção seguida de lesões ulcerosas (onde a deficiência da vitamina D produz osteomalácia com o conseqüente 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 o p-nitrofenilfosfato (p-NFF), que não tem cor, produzindo fosfato e p-nitrofenol em pH alcalino. A velocidade da aparição do ânion p-nitrofenolato (amarelo) a 405 nm, é proporcional à atividade enzimática da amostra.

## Reagentes fornecidos

**A. Reagente A:** solução de tampão DEA (dietanolamina), contendo sais de magnésio.

**B. Reagente B:** solução contendo p-nitrofenil fosfato (p-NFF).

## Concentrações finais

DEA.....1,0 mol/L

Mg .....0,5 mmol/L

p-NFF .....10 mmol/L

## Instruções para uso

**Reagentes Fornecidos:** prontos para uso. Podem ser utilizados separadamente ou como Reagente único, misturando 4 partes de **Reagente A** com 1 parte de **Reagente B** (ex: 4 mL Reagente A + 1 mL Reagente B).

## Indícios de instabilidade ou deterioração dos reagentes

Quando o espectrofotômetro for zerado com água destilada, leituras de absorvância do Reagente único (pré-misturado) superiores a 0,900 D.O., são indícios de deterioração.

## 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 (2-8°C) até a data de vencimento indicada na embalagem. Uma vez abertos, não devem permanecer destampados nem fora do refrigerador por períodos prolongados. Evitar contaminações.

**Reagente único (pré-misturado):** é estável um mês sob refrigeração (2-8°C), a partir do momento de sua preparação.

## Amostra

Soro ou plasma com heparina

**a) Coleta:** obter o soro da maneira habitual.

**b) Aditivos:** caso a amostra utilizada seja plasma, recomenda-se o uso de heparina como anticoagulante para sua obtenção.

**c) Estabilidade e instruções de armazenamento:** empregar soro preferencialmente recém coletado.

Caso o ensaio não seja efetuado dentro das 6 horas após a coleta, a amostra deve ser conservada a -20°C.

## Interferências

Não são observadas interferências por bilirrubina até 16 mg/dL, lipídeos até 1000 mg/dL de triglicérides, nem heparina até 50 UI/mL.

Hemólise moderada (até 200 mg/dL) não produz interferência, no entanto, hemólise muito severa pode alterar os resultados.

Referência bibliográfica Young à efeitos de drogas no método.

## Material necessário ( não fornecido)

- Espectrofotômetro.
- Micropipetas e pipetas para 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. Vide os "Valores de referência" correspondentes a cada temperatura.

- Tempo de reação: 3 minutos e 20 segundos

- Volume de amostra: 10 uL

Os volumes de amostra e Reagente podem variar proporcionalmente, sem que sejam alterados os fatores de cálculo.

## Procedimento I

### Técnica com reagente único

Numa cubeta mantida à temperatura da reação selecionada colocar:

Reagente único	1,0 mL
Pré-incubar uns minutos. Logo após acrescentar:	
Amostra	10 uL

Misturar rapidamente disparando ao mesmo tempo o cronômetro. Esperar 20 segundos e ler a absorvância inicial. Registrar a absorvância após 1, 2 e 3 minutos da primeira leitura. Determinar a diferença da média de Absorvância/min ( $\Delta A/min$ ), subtraindo cada leitura da anterior e calculando a média dos valores. Utilizar esta média para os cálculos.

### Cálculos dos resultados

Fosfatase alcalina (U/L) a 405 nm =  $\Delta A/min \times 5460$

## Procedimento II

### Técnica com reagentes separados

Numa cubeta mantida à temperatura da reação selecionada colocar:

Reagente A	1,0 mL
Amostra	10 uL
Pré-incubar uns minutos. Logo após acrescentar:	
Reagente B	0,25 mL

Misturar rapidamente disparando ao mesmo tempo o cronômetro. Esperar 20 segundos e ler a absorvância inicial. Registrar a absorvância após 1, 2 e 3 minutos da primeira leitura. Determinar a diferença da média de Absorvância/min ( $\Delta A/min$ ), 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 =  $\Delta A/min \times 6812$

Exemplo:

(Os dados apresentados a seguir são ilustrativos)

	Amostra	Diferença	Média
Absorvância A1	0,458		
Absorvância A2	0,499	0,041	
Absorvância A3	0,543	0,044	
Absorvância A4	0,586	0,043	0,043

Utilizando Fator teórico (37°C) / Técnica com reagentes separados:

Fosfatase Alcalina (U/L) =  $0,043 \times 6812 = 293$  U/L

Quando utilizado o Laborcal como calibrador:

Concentração de ALP no calibrador: 446 U/L (37°C)

	Calibrador	Diferença	Média
Absorvância A1	0,423		
Absorvância A2	0,488	0,065	
Absorvância A3	0,554	0,066	
Absorvância A4	0,619	0,065	0,065

Obtenção do fator de calibração:

$$\text{Fator} = \frac{[\text{ALP}_{\text{calibrador}}]}{\Delta A/min_{\text{calibrador}}} = \frac{446 \text{ U/L}}{0,065} = 6861$$

Fosfatase Alcalina (U/L) =  $\Delta A/min_{\text{amostra}} \times \text{Fator} = 0,043 \times 6861 = 295$  U/L

## Método de controle de qualidade

Processar 2 níveis de um material de controle de qualidade (**Laborcontrol 1** e **Laborcontrol 2** da Laborlab) 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 está aumentada na infância e adolescência (até os 18 anos, aproximadamente) produzindo valores de fosfatase alcalina mais elevados que nos adultos. Em condições normais consideram-se 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 em critérios estabelecidos, de acordo com o contexto da sua população.

#### Conversão de unidades ao sistema SI

ALP (U/L) x 0,017 = ALP (ukat/L)

#### Limitações do procedimento

Vide "Interferências".

Os anticoagulantes comuns, (tais como EDTA dissódico, oxalato, citrato ou fluoreto) produzem inibição da atividade de fosfatase alcalina.

O reagente pode obter coloração mesmo na presença de pequenas quantidades de soluções de limpeza com base em hipoclorito. Assegure o enxágue em abundância com água desmineralizada de todo o material que esteja em contato com hipoclorito, incluindo as agulhas e conexões dos analisadores, quando for empregada a técnica automática.

#### Desempenho

Os ensaios foram realizados em analisador Express Plus® (Ciba Corning Diagnostics).

**a) Reprodutibilidade:** processando segundo o documento EP5A do CLSI (ex-NCCLS), obtenha-se o seguinte:

##### Precisão intra-ensaio

Nível	D.P.	C.V.
119 U/L	± 2,6 U/L	2,2 %
347 U/L	± 2,6 U/L	0,7 %

##### Precisão total

Nível	D.P.	C.V.
119 U/L	± 2,9 U/L	2,4 %
347 U/L	± 3,2 U/L	0,9 %

**b) Linearidade:** a reação é linear até 1.500 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:** a mínima mudança de atividade detectável de ALP que pode ser diferenciada de zero é 18 U/L.

#### Parâmetros para analisadores automáticos

Para a programação, consultar o manual de uso do analisador a ser utilizado.

#### Apresentação

- 2 x 48 mL **Reagente A**

- 2 x 12 mL **Reagente B**

(Cód. 1770110)

#### 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. - Clin. Chem. 21/5: 246 D (1975).
- I.F.C.C. - Clin. Chim. Acta 87/3: 459F (1978).
- Demaría, I.; Setta, F.; Lorenzo, L. - Rev. Asoc. Bioq. Arg. 54/3 (1990).
- Schlebusch, H.; Rick, W.; Lang, H. and Knedel, M. - Dtsch. Med. Wschr. 99:765 (1974).
- Rick, W. - Klinische Chemie und Mikroskopie, p.294, 6th ed., Springer Verlag, Berlin (1990).
- NCCLS document "Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices", EP5-A (1999).
- NCCLS document "Evaluation of Linearity of Quantitative Analytical Methods", EP5-A (1986).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4th ed., 2001.

#### Termo de garantia

Este kit como um todo tem garantia de troca, desde que esteja dentro do prazo de validade e seja comprovado pelo Departamento Técnico da Laborlab Produtos para Laboratórios Ltda. que não houve falhas técnicas na execução e manuseio deste kit, assim como em sua conservação.

## SÍMBOLOS



Este produto preenche os requisitos da Diretiva Europeia 98/79 CE para dispositivos médicos de diagnóstico "in vitro"



Representante autorizado na Comunidade Europeia



Uso médico-diagnóstico "in vitro"



Conteúdo suficiente para <n> testes



Data de validade



Limite de temperatura (conservar a)



Não congelar



Risco biológico



Volume após da reconstituição



Conteúdo



Número de lote



Elaborado por:



Nocivo



Corrosivo / Caústico



Irritante



Consultar as instruções de uso



Calibrador



Controle



Controle Positivo



Controle Negativo



Número de catálogo



Produtos para Laboratórios Ltda.  
Estrada do Capão Bonito, 489  
Guarulhos - SP - Brasil - CEP: 07263-010  
CNPJ: 72.807.043/0001-94  
Atendimento ao cliente:  
+55 (11) 2480 0529/+55 (11) 2499 1277  
sac@laborlab.com.br  
www.laborlab.com.br