

FOSFATASE ALCALINA Liquiform

Instruções de Uso

Ref.: 79

ANVISA 10009010050

Finalidade . Sistema para determinação em modo cinético da Fosfatase Alcalina no soro ou plasma (heparina).

Uso profissional.

[Somente para uso diagnóstico in vitro.]

Princípio . A fosfatase alcalina (FALC) do soro, em pH alcalino, hidrolisa o p-nitrofenilfosfato liberando p-nitrofenol e fosfato inorgânico, segundo a reação seguinte:



A quantidade produzida de p-nitrofenol que tem elevada absorvância em 405 nm é diretamente proporcional à atividade enzimática da fosfatase alcalina na amostra.

Características do sistema . O substrato p-nitrofenilfosfato foi selecionado porque é prontamente hidrolisado pela fosfatase alcalina. O produto da hidrólise possui elevada absorvância molar, permitindo utilizar pequeno volume de amostra e curto tempo de reação porque utiliza um tampão transfosforilante que aumenta a velocidade do sistema.

O sistema se baseia no método de referência da AACC que otimiza todas as condições da reação, incluindo temperatura, pH, concentração dos reagentes e volume fracional da amostra. Este método, com pequenas modificações, está sendo considerado por várias organizações nacionais e internacionais interessadas em estabelecer um método de referência para a fosfatase alcalina.

As substâncias utilizadas na reação se encontram distribuídas adequadamente em dois reagentes para conferir maior estabilidade na forma líquida original e manutenção das condições ótimas da reação, permitindo a utilização direta dos reagentes em sistemas automáticos.

A metodologia monoreagente pode ser aplicada utilizando um Reagente de Trabalho estável por 30 dias sob refrigeração obtendo-se desempenho adequado mesmo em situações de baixas demandas do teste. O sistema permite ainda preparar o volume de Reagente de Trabalho necessário para apenas uma medição da atividade enzimática da fosfatase alcalina.

O sistema é simples e utiliza medidas em modo cinético contínuo, podendo ser facilmente aplicado em analisadores automáticos e semiautomáticos capazes de medir absorvância em 405 nm.

Metodologia . Bowers e Mc Comb modificado.

Reagentes

1. [R1] - Reagente 1 - Armazenar entre 2-8 °C.

Contém tampão ≤ 500 mmol/L pH 10,4; HEDTA $\leq 3,0$ mmol/L; sulfato de zinco $\leq 1,5$ mmol/L; acetato de magnésio 2,5 mmol/L; azida sódica 3,85 mmol/L.

2. [R2] - Reagente 2 - Armazenar entre 2-8 °C.

Contém p-Nitrofenilfosfato ≥ 60 mmol/L; fenol ≥ 50 mmol/L e estabilizador.

Os reagentes não abertos, quando armazenados nas condições indicadas, são estáveis até a data de expiração impressa no rótulo. Após abertos, os reagentes 1 e 2 são estáveis por 2 meses, armazenados entre 2 e 8 °C. Durante o manuseio os reagentes estão sujeitos a contaminações de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

Rastreabilidade do sistema . A absorvância molar do p-nitrofenol, produto da reação, é utilizada como sistema de referência para a calibração do ensaio.

Precauções e cuidados especiais

Os cuidados habituais de segurança devem ser aplicados na manipulação do reagente.

O Reagente 1 contém azida sódica, que é tóxica. Deve-se tomar cuidado para evitar a ingestão e no caso de contato com os olhos deve-se lavar imediatamente com grande quantidade de água e procurar auxílio médico. A azida pode formar compostos altamente explosivos com tubulações de chumbo e cobre. Portanto, utilizar grandes volumes de água para descartar o reagente.

Não utilizar o Reagente de Trabalho quando sua absorvância, medida contra a água em 405 nm, for igual ou maior que 1,2 ou quando mostrar-se turvo ou com sinais de contaminação.

Materiais necessários e não fornecidos

1. Fotômetro com cubeta termostatizada capaz de medir com exatidão a absorvância em 405 nm.
2. Pipetas para medir amostras e reagentes.
3. Cronômetro.

Amostra

A amostra de sangue deve ser obtida após jejum de no mínimo 8 horas. Soro ou plasma (heparina). A amostra é estável por 7 dias a 4 °C. Quando a amostra é armazenada na temperatura ambiente obtém-se resultados falsamente elevados.

Deve ser criado um Procedimento Operacional Padrão (POP) que estabeleça procedimentos adequados para coleta, preparação e armazenamento da amostra. Enfatizamos que os erros devidos à amostra podem ser muito maiores que os erros ocorridos durante o procedimento analítico.

Como nenhum teste conhecido pode assegurar que amostras de sangue não transmitem infecções, todas elas devem ser consideradas como potencialmente infectantes. Portanto, ao manuseá-las, devem-se seguir as normas estabelecidas para biossegurança.

Para descartar os reagentes e o material biológico sugerimos aplicar as normas locais, estaduais ou federais de proteção ambiental.

Interferências

Citrato, fluoreto, oxalato e EDTA são inibidores da atividade da fosfatase alcalina porque formam complexos com o magnésio.

Valores de Bilirrubina até 23 mg/dL não interferem na reação.

Amostras ligeiramente hemolisadas, com hemoglobina até 30 mg/dL, podem ser toleradas, mas hemólises mais acentuadas não devem ser aceitas porque produzem resultados falsamente diminuídos.

Valores de Triglicérides acima de 1000 mg/dL produzem resultados falsamente elevados.

Para avaliar a concentração aproximada da hemoglobina em uma amostra hemolisada pode-se proceder do seguinte modo: Diluir 0,05 mL da amostra em 2,0 mL de NaCl 150 mmol/L (0,85%) e medir a absorbância em 405 ou 415 nm acertando o zero com água deionizada ou destilada.

$$\begin{aligned} \text{Hemoglobina (mg/dL)} &\equiv \text{Absorbância}_{405} \times 601 \\ \text{Hemoglobina (mg/dL)} &\equiv \text{Absorbância}_{415} \times 467 \end{aligned}$$

Preparo do reagente de trabalho. O conjunto de um frasco do Reagente 1 e um frasco do Reagente 2 permite preparar o Reagente de Trabalho. Transferir o conteúdo de um frasco do Reagente 2 para um frasco do Reagente 1 e homogeneizar por inversão. Anotar a data de expiração.

Estável 5 dias entre 15-25 °C e 30 dias entre 2-8 °C quando não houver contaminação química ou bacteriana. Identificar o frasco do Reagente de Trabalho, para evitar confusão com outros frascos do Reagente 1. Para preservar o desempenho, o Reagente de Trabalho deve permanecer fora da geladeira somente o tempo necessário para se obter o volume a ser utilizado. Evitar exposição à luz solar direta.

Opcionalmente pode-se preparar menor volume do Reagente de Trabalho utilizando a proporção de 4 (quatro) volumes do Reagente 1 e 1 (um) volume do Reagente 2. Ex.: Para preparar 1 mL do Reagente de Trabalho misturar 0,8 mL do Reagente 1 com 0,2 mL do Reagente 2.

Procedimento

1. Em um tubo rotulado "Teste" pipetar 1,0 mL do Reagente de Trabalho.
2. Adicionar 0,02 mL da amostra, homogeneizar e transferir imediatamente para a cubeta termostatizada a $37 \pm 0,2$ °C. Esperar 1 minuto.
3. Fazer a leitura da absorbância inicial (A_1) disparando simultaneamente o cronômetro. Repetir a leitura após 2 minutos (A_2).

Para avaliar a linearidade da reação verificar se as absorbâncias medidas em intervalos de 1 minuto são comparáveis.

Calcular o (ΔA /minuto) subtraindo A_1 de A_2 e dividindo por 2.

Cálculos. Ver linearidade.

É uma prática habitual calcular os resultados de atividade enzimática utilizando um fator obtido em condições ótimas de reação que incluem: Comprimento de onda: 405 nm \pm 0,2 nm. Cubeta termostatizada a $37 \pm 0,2$ °C com 1,0 cm de espessura de solução. Banda de passagem \leq 8 nm. Luz espúria \leq 0,1 %.

Como na maioria das vezes não é possível trabalhar sob essas condições, as boas práticas de laboratório recomendam realizar a calibração do ensaio utilizando calibrador de enzimas indicado pelo fabricante do reagente. A Labtest indica a linha Calibra para calibração do sistema Fosfatase Alcalina Liquiform.

$$\Delta A \text{ Teste} = \frac{A_2 - A_1}{2}$$

Atividade da Fosfatase Alcalina = ΔA Teste x 2764

O fator 2764 foi calculado para as condições acima propostas. Recalcular o fator quando for efetuada qualquer modificação em um dos parâmetros utilizados para calculá-lo.

Ver método para cálculo do fator.

Exemplo

$$A_1 \text{ Teste} = 0,610$$

$$A_2 \text{ Teste} = 0,660$$

$$\Delta A/\text{minuto} = \frac{0,660 - 0,610}{2} = 0,025$$

$$\text{Fosfatase Alcalina (U/L) a } 37^\circ\text{C} = 0,025 \times 2764 = 69$$

Método para cálculo do fator

$$\text{Fator} = \frac{VT \times 1000}{\varepsilon \times VA \times d}$$

VT = volume total do ensaio (1,02 mL)
 VA = volume da amostra (0,02 mL)
 1000 = conversão de U/mL para U/L
 d = espessura da solução (1 cm)
 ε = absorvidade milimolar do p-nitrofenol em 405 nm (18,45)

Exemplo

$$\text{Fator} = \frac{1,02 \times 1000}{18,45 \times 0,02 \times 1} = 2764$$

Calibração

Calibrações manuais

Usar calibrador da Calibra H - Labtest

Intervalo de calibrações

Calibração de 2 pontos ao mudar de lote;

Calibração de 2 pontos quando o controle interno da qualidade indicar.

Sistemas automáticos

Branco de reagentes: água deionizada ou solução de cloreto de sódio 150 mmol/L (0,85%);

Usar calibrador Calibra H - Labtest.

Intervalo de calibrações

Calibração de 2 pontos ao mudar de lote;

Calibração de 2 pontos quando o controle interno da qualidade indicar.

Linearidade

A reação é linear até 1500 U/L. Para valores maiores diluir a amostra 1:10 com NaCl 150 mmol/L (0,1 mL de soro + 0,9 mL de NaCl 150 mmol/L), repetir a determinação e multiplicar o resultado obtido por 10.

Sugerimos a verificação da linearidade metodológica e fotométrica no mínimo semestralmente utilizando amostras com atividades até 1500 U/L.

Controle interno da qualidade . O laboratório deve manter um programa de controle interno da qualidade que defina claramente os regulamentos aplicáveis, objetivos, procedimentos, critérios para especificações da qualidade e limites de tolerância, ações corretivas e registro das atividades. Materiais de controle devem ser utilizados para avaliar a imprecisão e desvios da calibração. Sugere-se que as especificações para o coeficiente de variação e o erro total sejam baseadas nos componentes da variação biológica (VB)^{6,7}.

Intervalo de referência . Estes valores podem ser usados apenas como orientação.

Recomenda-se que cada laboratório estabeleça a sua própria faixa de valores de referência da população atendida.

	37 °C
Adultos (U/L)	27 - 100
Crianças* (U/L)	75 - 390

*(incluindo adolescentes até 16 anos)

Conversão de U/L para Unidades SI: (μkat/L) = U/L x 0,0167

Temperatura . A tabela abaixo permite converter a atividade medida em uma determinada temperatura para o valor que seria obtido na medição realizada em outras temperaturas.

Temperatura de trabalho	Fatores de correção da temperatura		
	25 °C	30 °C	37 °C
25 °C	-----	1,45	2,08
30 °C	0,69	-----	1,43
37 °C	0,48	0,70	-----

Exemplo: a atividade enzimática obtida em 37 °C deve ser multiplicada por 0,70 para se obter a atividade em 30°C ou por 0,48 para se obter a atividade em 25 °C.

Características do desempenho⁸

Estudos de comparação de Métodos . O método proposto foi comparado com método utilizando tecnologia similar, sendo obtidos os seguintes resultados:

	Método Comparativo	Método Labtest
Número de amostras	27	
Equação da regressão	Método Labtest (mg/L) = 0,9617 x Comparativo + 2,6861	
Coefficiente da correlação	0,999	

Utilizando a equação da regressão, o erro sistemático (bias) foi igual a 2,89% e 2,04% para as concentrações de 40 U/L e 150 U/L, respectivamente. Os resultados do estudo comparativo atendem à especificação desejável para Erro Sistemático (≤ 6,72%), baseada nos componentes da Variação Biológica (VB)⁶.

Estudos de Precisão . Os estudos de precisão foram realizados utilizando amostras com concentrações médias iguais a 126 U/L e 516 U/L de fosfatase alcalina.

Repetitividade - imprecisão intraensaio

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	20	126	1,43	1,14
Amostra 2	20	516	12,19	2,36

Reprodutibilidade - imprecisão total

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	20	126	2,24	2,36
Amostra 2	20	516	11,79	2,28

A especificação desejável para Coeficiente de Variação (≤ 3,23%) baseada nos componentes da VB6 é atendida para as duas amostras avaliadas.

Sensibilidade metodológica . Limite de detecção: 2,8 U/L. Equivale a 3 desvios padrão (DP) obtido a partir de 20 medições de uma amostra com concentração de fosfatase alcalina igual a 44 U/L.

Efeitos da diluição da matriz . Uma amostra com valor igual a 1413 U/L foi utilizada para avaliar a resposta do sistema nas diluições da matriz com NaCl 150 mmol/L. Usando fatores de diluição que variaram de 2 a 8 foi encontrada recuperação média de 103%.

Significado clínico . A fosfatase alcalina é produzida por muitos tecidos, principalmente por ossos, fígado, intestino e placenta, e é excretada pela bile. A dosagem sérica desta enzima é particularmente útil na investigação das doenças hepatobiliares e ósseas.

Níveis elevados de fosfatase alcalina ocorrem em pacientes com doenças ósseas caracterizadas por um aumento da atividade osteoblástica, como a osteíte deformante, raquitismo, osteomalácia, hiperparatireoidismo, metástase óssea, sarcoma osteogênico e doença de Paget.

Níveis elevados de fosfatase alcalina ocorrem também em pacientes com doenças obstrutivas das vias biliares, metástases hepáticas, doenças granulomatosas e na cirrose hepática. Nas doenças hepatocelulares como a hepatite aguda viral, em geral ocorre um ligeiro aumento da enzima.

Níveis diminuídos da fosfatase alcalina são encontrados na desnutrição crônica, na hipofosfatosemia e ocasionalmente no hipotireoidismo e anemia perniciosa.

Observações

1. A limpeza e secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.

2. O laboratório clínico tem como objetivo fornecer resultados exatos e precisos. A utilização de água de qualidade inadequada é uma causa potencial de erros analíticos. A água deionizada ou destilada utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes, usar nas medições e para uso no enxágue final da vidraria, deve ter resistividade ≥ 1 megaohm.cm ou condutividade ≤ 1 microsiemens/cm e concentração de silicatos $< 0,1$ mg/L. Quando a coluna deionizadora está com sua capacidade saturada ocorre produção de água alcalina com liberação de vários íons, silicatos e substâncias com grande poder de oxidação ou redução que deterioram os reagentes em poucos dias ou mesmo horas, alterando os resultados de modo imprevisível. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle da qualidade da água.

3. Como ocorre em toda medição da atividade enzimática, a rigorosa observação do tempo e da temperatura de incubação é de grande importância para a qualidade dos resultados obtidos.

4. Para uma revisão das fontes fisiopatológicas e medicamentosas de interferência nos resultados e na metodologia sugere-se consultar Young DS. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, 3ª edição, Washington: AACC Press, 1990.

Referências

1. 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.
2. McComb RB, Bowers GN, Upreti A. Clin Chem 1981;27:135-41.
3. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, Philadelphia: Elsevier Saunders 2006;607-611.

4. Tonks DB Quality Control in Clinical Laboratories, Warner-Chilcott Laboratories, Diagnostic Reagents Division, Scarborough, Canada, 1972.

5. Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T. Clin Chem 1981;27:493-501.

6. Westgard QC – Desirable Biological Variation Database Specifications. Disponível em: <<https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>> (acesso em 23/03/2022).

7. Basques JC. Especificações da Qualidade Analítica. Labtest Diagnóstica 2005.

8. Labtest: Dados de Arquivo.

Apresentação

Produto	Referência	Conteúdo
Fosfatase Alcalina Liquiform	79-4/30	R 1 1 4 x 24 mL
		R 2 2 4 x 6 mL
Fosfatase Alcalina Liquiform Labmax 560/400	79-4/50	R 1 1 4 x 39 mL
		R 2 2 4 x 11 mL
Fosfatase Alcalina Liquiform CS 400/800	79-2/64	R 1 1 2 x 51 mL
		R 2 2 2 x 13 mL

Estão disponíveis as aplicações para sistemas automáticos.

O número de testes em aplicações automáticas depende dos parâmetros de programação.

Informações ao consumidor

[Termos e Condições de Garantia]

A Labtest Diagnóstica garante o desempenho deste produto dentro das especificações até a data de expiração indicada nos rótulos desde que os cuidados de utilização e armazenamento indicados nos rótulos e nestas instruções sejam seguidos corretamente.

Labtest Diagnóstica S.A.

CNPJ: 16.516.296 / 0001 - 38

Av. Paulo Ferreira da Costa, 600 - Vista Alegre - CEP 33240-152
Lagoa Santa - Minas Gerais Brasil - www.labtest.com.br

Serviço de Apoio ao Cliente | 0800 031 34 11 (Ligação Gratuita)
e-mail: sac@labtest.com.br

Edição: Novembro, 1996

Revisão: Julho, 2022

Ref.: 280322(02)




























Copyright by Labtest Diagnóstica S.A.

Reprodução sob prévia autorização

Símbolos utilizados com produtos diagnósticos in vitro

Símbolos usados con productos diagnósticos in vitro

Symbols used with ivd devices

	Conteúdo suficiente para < n > testes Contenido suficiente para < n > tests Contains sufficient for < n > tests		Risco biológico Riesgo biológico Biological risk
	Data limite de utilização (aaaa-mm-dd ou mm/aaaa) Estable hasta (aaaa-mm-dd o mm/aaaa) Use by (yyyy-mm-dd or mm/yyyy)		Marca CE Marcado CE CE Mark
	Material Calibrador Material Calibrador Calibrator Material		Tóxico Tóxico Poison
	Material Calibrador Material Calibrador Calibrator Material		Reagente Reactivo Reagent
	Limite de temperatura (conservar a) Temperatura limite (conservar a) Temperature limitation (store at)		Fabricado por Elaborado por Manufactured by
	Representante Autorizado na Comunidade Europeia Representante autorizado en la Comunidad Europea Authorized Representative in the European Community		Número do lote Denominación de lote Batch code
	Consultar instruções de uso Consultar instrucciones de uso Consult instructions for use		Controle Control Control
	Número do catálogo Número de catálogo Catalog Number		Controle negativo Control negativo Negative control
	Adições ou alterações significativas Cambios o suplementos significativos Significant additions or changes		Controle positivo Control positivo Positive control
	Produto diagnóstico in vitro Dispositivo de diagnóstico in vitro In vitro diagnostic device		Controle Control Control
	Liofilizado Liofilizado Lyophilized		Corrosivo Corrosivo Corrosive
	Período após abertura Periodo post-abertura Period after-opening		Uso veterinário Uso veterinário Veterinary use
	Instalar até Instalar hasta Install before		Fabricado em Elaborado en Manufactured on
	Produto de uso único Producto de un solo uso Single use product		

Ref.: 280322 |