

Fosfatase alcalina

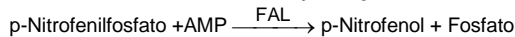
p-Nitrofenilfosfato. Cinético. AMP buffer (IFCC)

Determinação quantitativa da fosfatase alcalina (FAL) IVD

Armazenar a 2-8°C.

PRINCÍPIO DO MÉTODO

Ensaio fotométrico cinético, em conformidade com a *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicines (IFCC)*. A fosfatase alcalina (FAL) catalisa a transferência do grupo fosfato do p-nitrofenilfosfato (pNPP) para o 2-amino-2-metil-1-propanol libertando p-nitrofenol e fosfato, de acordo com a reacção seguinte:



A velocidade de formação do p-Nitrofenol, determinado fotometricamente, é proporcional à concentração catalítica de fosfatase alcalina na amostra testada^{1,2}.

SIGNIFICADO CLÍNICO

As fosfatases alcalinas são enzimas que se encontram presentes em quase todos os tecidos do organismo, sendo a sua presença particularmente elevada nos ossos, fígado, placenta, intestinos e rins.

Tanto o aumento como a diminuição dos níveis no plasma, têm significado clínico.

Causas mais prováveis do aumento dos níveis de FAL:

Doença óssea de Paget, obstruções hepáticas, hepatite, hepatotoxicidade por medicamentos e osteomalacia.

Causas mais prováveis da diminuição dos níveis de FAL:

Cretinismo e défice de vitamina C^{1,5,6}.

O diagnóstico clínico deve ser realizado tendo em consideração todos os dados clínicos e laboratoriais.

REAGENTES

| | | |
|------------------|--|------------|
| R 1 Tampão | 2-Amino-2-metil-1-propanol | 0,35 mol/L |
| | Sulfato de zinco | 1 mmol/L |
| | Acetato de Magnésio | 2 mmol/L |
| | N-ácido hidroxietililenediaminotriacético (EDTA) | 2 mmol/L |
| R 2 Substrato | p-Nitrofenilfosfato (pNPP) | 10 mmol/L |

PREPARAÇÃO

Reagente de trabalho (RT):

Mistura: 1 vol. (R2) Substrato + 4 vol. (R1) Tampão.

Estabilidade: 21 dias a 2-8 °C ou 5 dias à temperatura ambiente (15-25°C).

CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE

Todos os componentes do kit são estáveis até à data de validade que consta da etiqueta quando armazenados bem fechados a 2-8 °C protegidos da luz e quando as contaminações são evitadas durante a sua utilização. Não congelar.

Não utilizar as tabletes caso estejam fragmentadas.

Não utilizar os reagentes após passar o prazo de validade.

Sinais de deterioração dos reagentes:

- Presença de partículas e turvação.
- Absorvência nula (A) a 405 nm > 1,50.

EQUIPAMENTO ADICIONAL

- Espectrómetro ou colorímetro a medir a 405 nm.
- Banho termostático a 25°C, 30°C ou 37° C (± 0,1°C).
- Cuvetes equiparadas 1,0 cm passo de luz.
- Equipamento de laboratório geral.

AMOSTRAS

Soro ou plasma heparinizado¹.

Soro livre de hemólise, separado das hemácias o mais rápido possível.

Estabilidade: 3 dias a 2-8 °C.

PROCEDIMENTO

- Condições dos ensaios:
Comprimento de onda: 405 nm
Cuvete: 1 cm passo de luz
Temperatura constante 25 °C / 30 °C / 37 °C
- Ajustar o instrumento para zero com água destilada ou ar.
- Pipeta numa cuvette:

| | |
|--------------|-----|
| RT (µL) | 1,0 |
| Amostra (µL) | 20 |

- Misturar e incubar durante 1 minuto.

- Ler a absorvância inicial (A) da amostra, iniciar o cronómetro e ler absorvâncias em intervalos de 1 minuto e, depois, por 3 minutos.
- Calcular a diferença entre absorvâncias e as diferenças de absorvância médias por minuto (ΔA/min).

CÁLCULOS

$\Delta A/\text{min} \times 2764 = \text{U/L de FAL}$

Unidades: Uma unidade internacional (UI) é a quantidade de enzima que transforma 1 µmol de substrato por minuto, em condições padrão. A concentração é expressa em unidades por litro de amostra (U/L).

Factores de conversão de temperatura

Para corrigir resultados para outras temperaturas, multiplicar por:

| Ensaio temperatura | Factor de conversão para | | |
|--------------------|--------------------------|-------|-------|
| | 25 °C | 30 °C | 37 °C |
| 25 °C | 1,00 | 1,22 | 1,64 |
| 30 °C | 0,82 | 1,00 | 1,33 |
| 37 °C | 0,61 | 0,75 | 1,00 |

CONTROLO DE QUALIDADE

É conveniente analisar juntamente com as amostras de soros de controlo avaliadas: SPINTROL H Normal e Patológico (Ref. 1002120 e 1002210).

Se os valores de controlo estiverem fora do intervalo definido, verifique o instrumento, reagentes e técnicas.

Cada laboratório deve estabelecer o seu próprio esquema de Controlo de Qualidade e as ações correctivas no caso de os controlos não estarem de acordo com as tolerâncias aceitáveis.

VALORES DE REFERÊNCIA¹

| | 25 °C | 30 °C | 37 °C |
|---------|-------------|-------------|--------------|
| Adultos | 17 - 77 U/L | 21 - 94 U/L | 26 - 117 U/L |

Os factores que podem afectar os valores de referência são: exercício físico, períodos de crescimento em crianças e a gravidez.

Estes valores servem apenas como referência. Cada laboratório deve estabelecer o seu próprio intervalo de referência.

CARACTERÍSTICAS DO MÉTODO

Intervalo de medição: Do limite de detecção de 1,307 U/L até ao limite de linearidade de 1400 U/L.

Precisão:

| | Intra-ensaios (n=20) | | Inter-ensaios (n=20) | |
|-------------|----------------------|------|----------------------|------|
| Média (U/L) | 73 | 194 | 78 | 209 |
| SD | 1,67 | 3,03 | 2,13 | 4,90 |
| CV (%) | 2,27 | 1,58 | 2,72 | 2,34 |

Sensibilidade analítica: 1 U/L = 0,0004 ΔA/min.

Exactidão: Os resultados obtidos utilizando reagentes SPINREACT (y) não demonstram diferenças sistemáticas quando comparados com outros reagentes comerciais (x).

Os resultados obtidos utilizando 50 amostras foram os seguintes:

Coefficiente de correlação (r): 0,98929

Equação de regressão: $y = 2,214x + 2,131$.

Os resultados das características de desempenho dependem do analisador utilizado.

INTERFERÊNCIAS

O fluoreto, o oxalato, o citrato e o EDTA inibem a actividade da fosfatase alcalina, pelo que não devem ser utilizados como anticoagulantes.

A hemólise interfere devido à elevada concentração de fosfatase alcalina nas hemácias^{1,2}. Foram descritos vários fármacos e outras substâncias que interferem na determinação da fosfatase alcalina^{3,4}.

NOTAS

A SPINREACT dispõe de instruções detalhadas para a aplicação deste reagente em diferentes analisadores.

BIBLIOGRAFIA

- Wenger C. et al. Alkaline phosphatase. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1094-1098.
- Rosalki S et al. Clin Chem 1993; 39/4: 648-652.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.
- IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 1983; 21: 731-748.

APRESENTAÇÃO

| | | |
|------------|-----|------------|
| Ref: 41245 | R1: | 1 x 60 ml |
| | R2: | 1 x 15 ml |
| Ref: 41246 | R1: | 1 x 240 ml |
| | R2: | 1 x 60 ml |

Alkaline phosphatase

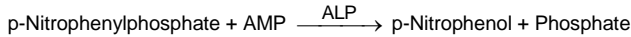
p-Nitrophenylphosphate. Kinetic. AMP buffer (IFCC)

Quantitative determination of alkaline phosphatase (ALP) IVD

Store at 2-8°C

PRINCIPLE OF THE METHOD

Kinetic photometric test, according to the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicines (IFCC). Alkaline phosphatase (ALP) catalyses the transfer of the phosphate group from p-nitrophenylphosphate to 2-amino-2-methyl-1-propanol (AMP), liberating p-nitrophenol according to the following reaction:



The rate of p-Nitrophenol formation, measured photometrically, is proportional to the catalytic concentration of alkaline phosphatase present in the sample^{1,2}.

CLINICAL SIGNIFICANCE

Alkaline phosphatase is an enzyme present in almost all tissues of the organism, being particularly high in bone, liver, placenta, intestine and kidney.

Both increases and decreases of plasma ALP are of importance clinically. Causes of increased plasma ALP: Paget's disease of bone, obstructive liver disease, hepatitis, hepatotoxicity caused by drugs or osteomalacia.

Causes of decreased plasma ALP: Cretinism and vitamin C deficiency^{1,5,6}. Clinical diagnosis should not be made on a single test result; it should integrate clinical and other laboratory data.

REAGENTS

| | | |
|------------|--|------------|
| R 1 | 2-Amino-2-methyl-1-propanol | 0,35 mol/L |
| | Zinc sulfate | 1 mmol/L |
| | Magnesium acetate | 2 mmol/L |
| | N-hydroxyethylethylenediaminetriacetic acid (EDTA) | 2 mmol/L |
| R 2 | p-Nitrophenylphosphate (pNPP) | 10 mmol/L |

PREPARATION

Working reagent (WR):

Mix: 4 vol. (R1) Buffer + 1 vol. (R2) Substrate

Stability: 21 days at 2-8°C or 5 days at room temperature (15-25°C).

STORAGE AND STABILITY

All the components of the kit are stable until the expiration date on the label when stored tightly closed at 2-8°C, protected from light and contaminations prevented during their use. Do not freeze the reagents.

Do not use the tablets if appears broken.

Do not use reagents over the expiration date.

Signs of reagent deterioration:

- Presence of particles and turbidity.
- Blank absorbance (A) at 405 nm > 1,50.

ADDITIONAL EQUIPMENT

- Spectrophotometer or colorimeter measuring at 405 nm.
- Thermostatic bath at 25°C, 30°C or 37°C (± 0.1°C)
- Matched cuvettes 1.0 cm light path.
- General laboratory equipment.

SAMPLES

Serum or heparinized plasma¹. Use unhemolyzed serum, separated from the clot as soon as possible. Stability: 3 days at 2-8°C.

PROCEDURE

1. Assay conditions:
 Wavelength: 405 nm
 Cuvette: 1 cm light path
 Constant temperature 25°C / 30°C / 37°C

2. Adjust the instrument to zero with distilled water or air.
3. Pipette into a cuvette:

| | |
|-------------|-----|
| WR (mL) | 1,0 |
| Sample (µL) | 20 |

4. Mix, incubate for 1 minute.
5. Read initial absorbance (A) of the sample, start the stopwatch and read absorbances at 1 minute intervals thereafter for 3 minutes.
6. Calculate the difference between consecutive absorbances and the average absorbance differences per minute (ΔA/min).

CALCULATIONS

$$\Delta A/\text{min} \times 2764 = \text{ALP ACTIVITY (U/L)}$$

Units: One international unit (IU) is the amount of enzyme that transforms 1 µmol of substrate per minute, in standard conditions. The concentration is expressed in units per litre of sample (U/L).

Temperature conversion factors

To correct results to other temperatures multiply by:

| Assay temperature | Conversion factor to | | |
|-------------------|----------------------|------|------|
| | 25°C | 30°C | 37°C |
| 25°C | 1,00 | 1,22 | 1,64 |
| 30°C | 0,82 | 1,00 | 1,33 |
| 37°C | 0,61 | 0,75 | 1,00 |

QUALITY CONTROL

Control sera are recommended to monitor the performance of assay procedures: SPINTROL H Normal and Pathologic (Ref. 1002120 and 1002210).

If control values are found outside the defined range, check the instrument, reagents and technique for problems.

Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

REFERENCE VALUES¹

| | | | |
|--------|-------------|-------------|--------------|
| | 25°C | 30°C | 37°C |
| Adults | 17 - 77 U/L | 21 - 94 U/L | 26 - 117 U/L |

Factors affecting ALP activities in a normal population include exercise, periods of repaid growth in children and pregnancy.

These values are for orientation purpose; each laboratory should establish its own reference range.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Measuring range: From detection limit of 1,307 U/L to linearity limit of 1400 U/L. If the results obtained were greater than linearity limit, dilute the sample 1/10 with NaCl 9 g/L and multiply the result by 10.

Precision:

| Mean (U/L) | Intra-assay (n=20) | | Inter-assay (n=20) | |
|------------|--------------------|------|--------------------|------|
| | 73 | 194 | 78 | 209 |
| SD | 1,67 | 3,03 | 2,13 | 4,90 |
| CV (%) | 2,27 | 1,58 | 2,72 | 2,34 |

Sensitivity: 1 U/L = 0.0004 ΔA / min.

Accuracy: Results obtained using SPINREACT reagents (y) did not show systematic differences when compared with other commercial reagents (x).

The results obtained using 50 samples were the following:

Correlation coefficient (r): 0,98929.

Regression equation: y = 2,214x + 2,131.

The results of the performance characteristics depend on the analyzer used.

INTERFERENCES

Fluoride, oxalate, citrate and EDTA inhibit alkaline phosphate activity and should therefore not be used as anticoagulants. Haemolyses interferes due to the high concentration of alkaline phosphatase in red cells^{1,2}.

A list of drugs and other interfering substances with acid phosphatase determination has been reported by Young et. al^{3,4}.

NOTES

SPINREACT has instruction sheets for several automatic analyzers. Instructions for many of them are available on request.

BIBLIOGRAPHY

1. Wenger C. et al. Alkaline phosphatase. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1094-1098.
2. Rosalki S et al. Clin Chem 1993; 39/4: 648-652.
3. Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
4. Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
5. Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
6. Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.
7. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 1983; 21: 731-748.

PACKAGING

| | | | |
|------------|-------|-----|------------|
| Ref: 41245 | | R1: | 1 x 60 mL |
| | | R2: | 1 x 15 mL |
| Ref: 41246 | Cont. | R1: | 1 x 240 mL |
| | | R2: | 1 x 60 mL |