FOSFATASE ALCALINA

MÉTODO:
Cinético IFCC.

FINALIDADE:
Kit de reagentes para a determinação quantitativa da fosfatase alcalina no soro ou plasma heparinizado em sistemas fotométricos.
Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

SIGNIFICADO CLÍNICO:
A fosfatase alcalina (FAL) está presente em diversos tecidos, incluindo o fígado, ossos, rins, intestinos e placenta. A atividade de FAL eleva-se rapidamente em até 10 vezes o valor normal quando o fluxo biliar está prejudicado ou quando ocorrem lesões expansivas ou numerosas como uma metástase tumoral. Níveis elevados ocorrem também pelo aumento da atividade osteoblástica, observado no crescimento ósseo natural de crianças e jovens, mas também em distúrbios como a osteíte deformante, raquitismo, osteomalácia, hiperparatiroidismo, fraturas e tumores ósseos osteoblásticos.

FUNDAMENTO:
Na presença de íons de magnésio e zinco, o 4-nitrofenilfosfato é hidrolisado pelas fosfatases formando fosfato e 4-nitrofenol. Neste processo, o aminometilpropanol funciona como aceptor transiente do fosfato. A formação do composto cromógeno 4-nitrofenol é proporcional à atividade de FAL e é medido fotometricamente:

$$4\text{-}nitrofenilfosfato + O_2 \xrightarrow[(Mg^{2+}\ Zn^{2+})]{FAL} Fosfato + 4\text{-}nitrofenol$$

IDENTIFICAÇÃO E ARMAZENAMENTO:
Conservar entre 2 e 8 °C.

COMPOSIÇÃO:

R1:		
Tampão aminometilpropanol, pH 10,4	1,0	mol/L
Acetato de magnésio	≥2,0	mmol/L
Sulfato de zinco	≥0,5	mmol/L
EDTA	≥2,0	mmol/L
Azida sódica	≥0,5	g/L
Surfactantes e conservantes	<1,0	g/L
R2:		
4-Nitrofenilfosfato	≥70	mmol/L
Estabilizante	<5,0	g/L

MODO DE USO:
Os reagentes estão prontos para uso e não dependem de preparo.

Opcionalmente, os reagentes podem ser utilizados como Reagente de Trabalho. Sendo que, nesse caso, a proporção da mistura é de 4 partes de Reagente 1 com 1 parte do Reagente 2. Homogeneizar antes do uso.

ESTABILIDADE:
R1 e R2 são estáveis até a data de validade impressa no rótulo se mantidos fechados em temperatura entre 2 e 8 °C.
O Reagente de trabalho é estável por 28 dias entre 2 e 8 °C.
Não congelar!

Estabilidade *on board*
Após a abertura e instalação no analisador, os reagentes permanecem estáveis **por até 53 dias**, desde que mantidos no compartimento refrigerado dos analisadores Vyttra – BM SERIES.

Deve-se substituir o reagente imediatamente ao identificar sinais de instabilidade ou deterioração, tais como:
- Degradação Física: Presença de turbidez, precipitação ou alteração na coloração original da solução e sinais visíveis de vazamento.
- Inconsistência Analítica: Resultados de controles fora dos limites de tolerância, critérios de aceitação estabelecidos, ou falhas consecutivas no processo de calibração do sistema analítico.

Frequência de Calibração
A calibração desse ensaio deve ser realizada quando inserido no sistema. Uma nova calibração deverá ser executada quando houver:
- Troca de Lote: Instalação de um novo lote de reagentes
- Intervenção Técnica: Após manutenções preventivas ou corretivas.
- Inconsistência Analítica: Resultados de controles fora dos critérios de aceitação estabelecidos.

A calibração do ensaio é válida **por até 30 dias**, podendo ser antecipada caso um dos cenários acima ocorra.

Nota: A periodicidade da calibração pode ser redefinida pelo laboratório, desde que fundamentada em evidências documentadas que comprovem a manutenção do desempenho analítico dentro dos limites especificados.

TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA:
O fabricante garante a qualidade do produto, se este for armazenado como descrito acima e em sua embalagem original.

PRECAUÇÕES:
- A manutenção das características de desempenho e da segurança do produto é também de responsabilidade do laboratório usuário, que deve assegurar o cumprimento das Boas Práticas de Laboratório, a utilização conforme esta Instrução de Uso, o armazenamento, transporte e manuseio adequados, a calibração, verificação e manutenção dos equipamentos, a capacitação dos profissionais envolvidos, bem como a utilização de níveis de controle de qualidade apropriados ao ensaio, conforme os requisitos aplicáveis.
- Os reagentes não necessitam ser tratados como amostras contaminantes.
- Os cuidados habituais de segurança devem ser aplicados na manipulação do reagente.
- Não há como assegurar que amostras biológicas e soros controles estão totalmente isentos de agentes infecciosos, portanto, é recomendado manuseá-los de acordo com as instruções de biossegurança. Para as informações de segurança do produto, consultar a Ficha de Segurança (FDS).
- Para o descarte seguro dos reagentes e materiais biológicos, sugerimos utilizar as regulamentações normativas locais, estaduais ou federais para a preservação ambiental.
- Os reagentes contêm azida sódica como conservante. Evitar contato com a pele e mucosas. Em caso de contato com os olhos, lavar com bastante água por vários minutos.

AMOSTRA BIOLÓGICA:
Soro ou plasma (heparina) livres de hemólise.
Os anticoagulantes EDTA e citrato são capazes de se ligar ao cofator zinco e provocar resultados falsamente diminuídos.

ESTABILIDADE DAS AMOSTRAS:
A estabilidade da fosfatase alcalina é de 7 dias em temperatura entre 2 e 8 °C.
Descongelar as amostras apenas uma vez e descartar amostras contaminadas!

INTERFERENTES:
Nenhuma das substâncias abaixo apresentou interferência até as seguintes concentrações:

Ácido ascórbico	30 mg/dL
Bilirrubina	30 mg/dL
Hemoglobina	200 mg/dL
Triglicérides	2000 mg/dL

MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS:
- Fotômetro UV/VIS
- Pipetas
- Cronômetro
- Tubos de ensaio
- Solução NaCl 9,0 g/L
- Banho-maria a 37 °C
- Controles e calibrador

MÉTODO DE ANÁLISE:
A-Preparo:
Termostatizar o reagente de uso na temperatura desejada. A temperatura deve permanecer constante (±0,5 °C) durante a execução do teste.

B-Leitura em espectrofotômetro:
Comprimento de onda (λ): 405 nm (400 a 420 nm)
Temperatura: 37 ±0,5 °C
Tipo de reação: Cinética crescente
Calibração: Linear de 2 pontos, contra reagente branco

C-Esquema de pipetagem
1- Em três tubos ou cubetas marcados como Branco, Padrão e Amostra, proceder conforme o protocolo a seguir:

Pipetar	**Tubos ou cubetas**		
	Branco	**Padrão**	**Amostra**
R1	1000 µL	1000 µL	1000 µL
Água	20 µL	---	---
Calibrador/Padrão	---	20 µL	---
Amostra	---	---	20 µL
Homogeneizar bem e incubar por 1 minuto, então adicione:			
R2	250 µL	250 µL	250 µL

2- Homogeneizar bem, incubar a 37 °C e ler a absorbância inicial a 405 nm (400 a 420 nm) após 1 minuto, acionando o cronômetro simultaneamente
3- Ler novamente a absorbância após 1, 2 e 3 minutos, respeitando o mesmo comprimento de onda utilizado na absorbância inicial.

D-Cálculo com Calibrador/Padrão:
Para avaliar a linearidade da reação, observar se as diferenças de absorbância a cada minuto são equivalentes. Calcular a média das diferenças das absorbâncias por minuto (ΔAbs/min):

$$\Delta Abs/min = \frac{(Abs1 - Abs0) + (Abs2 - Abs1) + (Abs3 - Abs2)}{3}$$

$$\text{Atividade da FAL (U/L)} = \frac{\Delta Abs/min_{Amostra}}{\Delta Abs/min_{Padrão}} \times \text{Concentração do Padrão}$$

Exemplo:

Padrão:	Amostra:
A0 = 1,015	A0 = 1,184
A1 = 1,076	A1 = 1,227
A2 = 1,138	A2 = 1,270
A3 = 1,201	A3 = 1,315

$$\Delta Abs/min_{Padrão} = \frac{(1,076 - 1,015) + (1,138 - 1,076) + (1,201 - 1,138)}{3} = 0,062$$

$$\Delta Abs/min_{Amostra} = \frac{(1,227 - 1,184) + (1,270 - 1,227) + (1,315 - 1,267)}{3} = 0,045$$

Padrão = 150 U/L

$$\text{Atividade da FAL (U/L)} = \frac{0,045}{0,062} \times 150 = \mathbf{109\ U/L}$$

E-Cálculo com fator:
O fator calculado baseado no coeficiente de extinção molar varia dependendo do comprimento de onda:

FOSFATASE ALCALINA

FAL, 37 °C	3298× ΔAbs/min

VALORES DE REFERÊNCIA:

Crianças e adolescentes até 15 anos	75 – 390 U/L	(1,25 – 6,51 µkat/L)
Adultos	27 – 100 U/L	(0,45 – 1,67 µkat/L)

Esses valores são fornecidos somente como orientação, cada laboratório deve estabelecer sua faixa de referência.
Conversão unitária: 1 U/L × 0,0167 = µkat/L

AUTOMAÇÃO:
Adaptação especial para analisadores está disponível e será enviada quando solicitada.

LINEARIDADE:
A reação é linear até a concentração de 1200 U/L (20 µkat/L). Se os valores excederem esse intervalo, as amostras devem ser diluídas com solução NaCl 9,0 g/L e multiplicadas pelo fator de diluição aplicado.

SENSIBILIDADE:
O limite inferior de detecção é 2,5 U/L (0,04 µkat/L).

PRECISÃO:
Repetibilidade:
A repetibilidade foi calculada a partir de 25 determinações sucessivas, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

INTRAENSAIO *n = 25*	Média (U/L)	Desvio padrão (U/L)	CV%
Amostra 1	50,4	0,894	1,77%
Amostra 2	153,1	2,356	1,54%
Amostra 3	308,8	3,124	1,01%

Reprodutibilidade:
A reprodutibilidade foi calculada a partir de 25 determinações sucessivas durante 5 dias consecutivos, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

INTERENSAIO *n = 25*	Média (U/L)	Desvio padrão (U/L)	CV%
Amostra 1	51,3	0,799	1,56%
Amostra 2	153,3	2,654	1,73%
Amostra 3	307,4	4,402	1,43%

COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS:
Foram realizados testes com 98 amostras comparando-se o reagente FOSFATASE ALCALINA (y) a um teste comercialmente disponível (x). A análise de regressão linear de Passing-Bablok resultou em:

$y = 0{,}979x + 0{,}398$ coeficiente de correlação (r-Pearson) = 0,9922

CALIBRAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE:
Para Calibração e Controle Interno de Qualidade Laboratorial recomenda-se o uso do calibrador e controles abaixo:
VYTCAL Multicalibrador Universal Bioquímica Clínica
VYTCON BQ I
VYTCON BQ II

APRESENTAÇÕES:

	REFERÊNCIA	VOLUME	CONTEÚDO R1	CONTEÚDO R2
FOSFATASE ALCALINA (Universal)	VYT010307181EN	150 mL	4 x 30 mL	2 x 15 mL
FOSFATASE ALCALINA (BM SERIES I)	VYT010308791EN	100 mL	2 x 40 mL	2 x 10 mL
FOSFATASE ALCALINA (BM SERIES III)	VYT010307453EN	150 mL	2 x 60 mL	2 x 15 mL

ANVISA: 81692610094

BIBLIOGRAFIA:

1. Guder WG et al. List of Analytes Preanalytical Variables. In: Samples: From the Patient to the Laboratory, 2nd Ed. 2003.
2. Ricos C et al. Scand J Clin Lab Invest. 59:491-500, 1999.
3. Statland B.E. Clinical Decision Levels for Laboratory Tests, Second Edition [Oradell NJ;Medical Economics Books, 1987.
4. Frase, CG. Biological Variation: from principles to pratice; AACC Press, 2001.
5. Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Clin Chem. 24:863-8690, 1986.
6. Young DS. Ann Clin Biochem. 34(6):579-581, 1997
7. Berk PD, Korenblat KM. Approach to the patient with jaundice or abnormal liver tests. In: Goldman L, Schafer AI, eds. Goldman-Cecil Medicine. 25th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; chap 147, 2016.
8. Clancy D et al. AAPS PharmSciTech. 18, 1158–1176, 2017.
9. MacKintosh, C. In D.G. Hardie (Ed.), Protein Phosphorylation: A Practical Approach. New York: IRL Press, 1993.
10. Wong ECC et al. Pediatric Reference Intervals, 8th Ed. San Diego, CA: AACC Press, 2021.
11. Wu AHB. Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests., 4th Ed. Missoouri: Elsevier (Saunders), 2006.

SERVIÇO DE ATENDIMENTO AO CLIENTE – SAC:
Dúvidas técnicas no procedimento ou manuseio deste kit, entrar em contato com:

ASSESSORIA CIENTÍFICA – VYTTRA DIAGNÓSTICOS
Tel. 0800 703 4043

FABRICANTE:

Vyttra Diagnósticos S.A.
Avenida Radamés Lo Sardo, 222 - Bairro Uberaba - Bragança Paulista - São Paulo
CEP: 12908-829 CNPJ: 00.904.728/0012-09
Responsável Técnica: Patrícia Yamaguti - CRF/SP: 32622

SIGNIFICADO DOS SÍMBOLOS UTILIZADOS NOS RÓTULOS DO PRODUTO:

	Data de Fabricação
	Data de Validade
	Limite de Temperatura
REF	Código do Produto
	Consultar Instruções de Uso
LOT	Número do Lote
IVD	Produto para Diagnóstico In Vitro