

# FOSFATASE ALCALINA LIQUIFORM VET

Instruções de Uso

Ref.: 1011

**Finalidade** . Sistema para determinação em modo cinético da Fosfatase Alcalina no soro.

**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 AACCC 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 semi-automáticos 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  $\leq 500$  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  $\geq 60$  mmol/L; fenol  $\geq 50$  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 - 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

Deve ser criada 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.

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 entre 2 - 8 °C. Quando a amostra é armazenada na temperatura ambiente obtém-se resultados falsamente elevados.

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.

$$\text{Hemoglobina (mg/dL)} \cong \text{Absorbância}_{405} \times 601$$

$$\text{Hemoglobina (mg/dL)} \cong \text{Absorbância}_{415} \times 467$$

**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.

O Reagente de Trabalho contém tampão pH 4,0, sulfato de zinco 1,2 mmol/L, fenol  $\geq$  10 mmol/L, HEDTA 2,4 mmol/L, acetato de magnésio 2,0 mmol/L, p-nitrofenil fosfato  $\geq$  12 mmol/L, azida sódica 3,1 mmol/L.

## 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 ( $\Delta A$ /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 H VET para calibração do sistema Fosfatase Alcalina Liquiform VET.

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

Atividade da Fosfatase Alcalina =  $\Delta A \text{ Teste} \times 2764$

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

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

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)

$\epsilon$  = absorptividade 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 Calibra VET- 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 VET- 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)<sup>6,7</sup>.

**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.

**Intervalo de referência** . Os intervalos devem ser usados apenas como orientação. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça, na população de animais atendida, seu próprio intervalo de referência.

É importante ressaltar que os animais jovens, comumente apresentam valores moderadamente mais elevados de atividade sérica de fosfatase alcalina, em relação ao intervalo de referência de adultos.

Espécie	Concentração (U/L)
Canina	10 a 96
Felina	10 a 96
Equina	143 a 395

## Características do desempenho<sup>8</sup>

**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 = 0,9617 x Comparativo + 2,6861
Coefficiente de 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.

**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 (U/L)	DP (U/L)	CV (%)
Amostra 1	20	126	1,43	1,14
Amostra 2	20	516	12,19	2,36

## Reprodutibilidade - imprecisão total

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

**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<sup>9,10</sup>** . A Fosfatase alcalina é uma enzima de indução sintetizada no fígado, nos osteoblastos, nos epitélios intestinal, renal e na placenta. No entanto, são os hepatócitos que respondem pela maior parte da atividade sérica normal da Fosfatase Alcalina.

Doenças do trato biliar, em especial colestase, causam um aumento maciço da FA, principalmente em cães. Lipidose hepática ou inflamação do parênquima hepático também pode ter esse efeito.

O aumento da atividade sérica dessa enzima pode ser notado em casos de maior atividade osteoblástica, doenças crônicas e algumas neoplasias.

Glicocorticóides e medicações anticonvulsivantes aumentam a atividade sérica de Fosfatase Alcalina em cães.

Animais em fase de crescimento, por possuírem maior atividade osteoblástica, apresentam discreto aumento da atividade sérica da Fosfatase Alcalina.

Quadros como ser raquitismo, osteomalácea, hiperparatireoidismo, osteossarcoma, metástase óssea, podem produzir elevações moderadas na atividade da Fosfatase Alcalina.

Cães com síndrome de cushing frequentemente apresentam a atividade sérica dessa enzima aumentada.

## 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  $\geq 1$  megaohm.cm ou condutividade  $\leq 1$  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. Tietz NW, Burtis CA, Ducan P et al. Clin Chem 1983;29: 751-761.
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.

9. Kerr MG. Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária, Bioquímica Clínica e Hematologia. Roca. 2003.

10. Thrall MA, et al. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. Roca. 2007.

## Apresentação

Produto	Referência	Conteúdo	
Fosfatase Alcalina Liquiform Vet	1011-4/30	RT1	4 x 24 mL
		RT2	4 x 6 mL

Para informações sobre outras apresentações comerciais consulte o site [www.labtest.com.br](http://www.labtest.com.br) ou entre em contato com o SAC.

## 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](http://www.labtest.com.br)

Serviço de Apoio ao Cliente | 0800 031 34 11 (Ligação Gratuita)

e-mail: [sac@labtest.com.br](mailto:sac@labtest.com.br)

Edição: Julho, 2012

Revisão: -

Ref.: 120422(01)




























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

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

Ref.: 280322 |