

# FRUTOSAMINA VET

Instruções de Uso

Ref.: 1019

**Finalidade** . Sistema de determinação da frutossamina por método cinético de tempo fixo em amostras de soro.

**Uso profissional.**

**[Somente para uso diagnóstico *in vitro*]**

**Princípio** . A glicose presente no soro se liga às proteínas plasmáticas formando uma base de Schiff, que após um rearranjo molecular, transforma-se em uma cetoamina estável denominada genericamente frutossamina<sup>1</sup>. A quantificação da frutossamina reflete o nível glicêmico dos animais nos últimos 7 a 15 dias, sem sofrer influência da hiperglicemia causada pela alimentação e pelo estresse no momento da coleta, situações recorrentes na medicina veterinária.<sup>2</sup>

Em pH alcalino a frutossamina é convertida à forma enólica, que reduz o azul de nitrotetrazólio a um "formazen púrpura". A medida da diferença de absorbância após incubação é proporcional à concentração de frutossamina na amostra<sup>3</sup>. A calibração do sistema é realizada com calibrador de matriz bovina, calibrado com polilisina glicada. Os resultados são expressos em micromoles/litro ( $\mu\text{mol/L}$ ).

**Características do sistema** . A determinação de frutossamina, formada pela ligação da glicose com as proteínas plasmáticas, baseia-se na sua capacidade redutora em meio alcalino. O ácido úrico presente no soro é um agente redutor que pode causar interferência no ensaio. Frutossamina VET (Ref. 1019) possui a enzima Úricase no Reagente 1, minimizando as interferências do ácido úrico no ensaio.

A calibração com calibrador de matriz bovina faz com que pequenas variações das condições do teste não produzam interferências importantes<sup>3</sup>. Os benefícios deste sistema são resultados mais consistentes, com maior reprodutibilidade e exatidão.

O sistema utiliza um Reagente de Trabalho estável por 30 dias, quando armazenado entre 2 - 8 °C, permitindo também preparar o volume de Reagente de Trabalho necessário a uma única medição da concentração da frutossamina. Os reagentes não devem permanecer abertos por um período prolongado, pois a exposição ao ar atmosférico pode ocasionar diminuição da estabilidade dos mesmos.

O método é facilmente aplicável aos analisadores automáticos e semiautomáticos capazes de medir, em modo cinético, diferenças de absorbâncias em 530nm.

**Metodologia** . Redução do NBT

## Reagentes

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

Contém tampão 83 mmol/L pH 7,3; azul de nitrotetrazólio (NBT) 967  $\mu\text{mol/L}$ ; uricase  $\geq 5000$  U/L; azida sódica 14,6 mmol/L; surfactantes e estabilizadores.

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

Após o manuseio armazenar bem vedado. Contém tampão 625 mmol/L pH 10,4 e azida sódica 14,6 mmol/L.

### 3. [CAL] - Calibrador - Concentração no rótulo do frasco. Armazenar entre 2 - 8 °C.

Reagente liofilizado. Contém albumina bovina glicada; tampão 50 mmol/L, pH 7,4 e azida sódica 14,6 mmol/L.

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

## Precauções e cuidados especiais

**Manter os reagentes abertos somente o tempo necessário para a execução do teste. A exposição ao ar atmosférico reduz a estabilidade dos reagentes, comprometendo o resultado de modo imprevisível.**

O controle da temperatura e do tempo de incubação durante a realização do ensaio deve ser rigoroso. A diferença de 1 °C na temperatura introduz ao erro de 5%, enquanto que 1 minuto de diferença durante a medida do  $\Delta A$  produz erro de 20%.

Os cuidados habituais de segurança devem ser aplicados na manipulação dos reagentes, os quais não devem ser pipetados com a boca.

Os reagentes contêm 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 os reagentes.

## Material necessário e não fornecido

1. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 °C).
2. Fotômetro capaz de medir com exatidão absorbância entre 510 e 550 nm.
3. Pipetas para medir amostras e reagentes.
4. Cronômetro.

**Influências pre-analíticas** . A utilização de Levodopa pode provocar resultados falsamente aumentados de Frutossamina.<sup>4</sup>

## Amostra

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

Utilizar soro ou plasma (Heparina ou EDTA). Soros de cães são estáveis por 5 dias a 4 °C ou 25 °C e por 28 dias quando mantido a -20 °C.<sup>5</sup>

Como nenhum teste conhecido pode assegurar que amostras de sangue não transmitam infecções, todas elas devem ser consideradas como potencialmente infectantes. Portanto, ao manuseá-las devem ser seguidas 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<sup>6</sup>

Concentrações de hemoglobina superiores a 100 mg/dL em soros de cães e equinos produzem aumento significativo na quantificação de frutossamina. Em felinos, esse aumento ocorre em amostras com hemoglobina superior a 50 mg/dL.

Para avaliar a concentração aproximada de 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 nm ou 415 nm acertando o zero com água deionizada ou destilada.

$$\text{Hemoglobina (mg/dL)} \cong \text{Absorbância}_{405} \times 601$$
$$\text{Hemoglobina (mg/dL)} \cong \text{Absorbância}_{415} \times 467$$

Concentrações de bilirrubina até 5 mg/dL e glicose até 1000 mg/dL não interferem significativamente. Amostras turvas, principalmente decorrentes de lipemia, não devem ser utilizadas podendo acarretar em resultados falsamente reduzidos.

## Preparo dos reagentes

**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. Identificar o frasco do Reagente de Trabalho e anotar a data de expiração. O reagente de Trabalho pode ser utilizado por 30 dias se armazenado entre 2 - 8 °C, quando não houver contaminação química ou microbiana (ver item Calibração).

O reagente de trabalho é uma solução alcalina (pH = 10,3) e, como tal, é instável quando exposto ao ar atmosférico. Portanto, este reagente pode ter seu desempenho comprometido, de modo imprevisível, se mantido aberto, seja no analisador automático, seja na bancada. Para preservar o desempenho, o reagente de trabalho deve permanecer aberto somente o tempo necessário para se obter o volume a ser utilizado. Armazenar bem vedado.

Opcionalmente, pode-se preparar menor volume do Reagente de Trabalho utilizando a proporção de 3 (três) volumes do Reagente 1 e 2 (dois) volumes do Reagente 2.

**Exemplo** . para preparar 10 mL de Reagente de Trabalho deve-se misturar 6 mL do Reagente 1 e 4 mL do Reagente 2.

O Reagente de Trabalho contém tampão fosfato 50 mmol/L, tampão carbonato 250 mmol/L, azul de nitrotetrazólio 580 µmol/L, uricase ≥3000 U/L, detergentes e estabilizadores em pH 10,3.

**Calibrador** . Reconstituir o conteúdo do frasco calibrador (Reagente 3) com 2,0 mL de água destilada ou deionizada e deixar em repouso por 30 minutos. Homogeneizar por inversão. Estável 60 dias entre 2 - 8 °C e 6 meses a 10 °C negativos. Homogeneizar antes da utilização.

## Procedimento

Este procedimento se aplica aos analisadores semiautomáticos que utilizam unicamente cubeta de fluxo. Estão disponíveis aplicações para sistemas automáticos e semiautomáticos.

Vide observações 1, 2 e 3.

Identificar 2 tubos de ensaio como "Teste" e "Calibrador" e proceder como a seguir:

	Teste	Calibrador
Reagente de Trabalho	1,0 mL	1,0 mL

Incubar a 37 °C durante 2 minutos

Amostra	0,050 mL	-----
Calibrador	-----	0,050 mL

Misturar bem e incubar a 37 °C. Após exatamente 10 minutos (cronometrados) determinar as absorbâncias ( $A_1$ ) do teste e do calibrador 530 nm (510 - 550), acertando o zero com água destilada ou deionizada. Continuar a incubação a 37 °C por mais exatamente 5 minutos (cronometrados) e determinar as absorbâncias ( $A_2$ ) do teste e do calibrador em 530 nm (510 - 550), acertando o zero com água destilada).

O procedimento sugerido para medição é adequado para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 1,0 mL. Deve ser feita uma verificação da necessidade de ajuste do volume para o fotômetro utilizado. Os volumes de amostra e reagente podem ser modificados proporcionalmente sem prejuízo para o desempenho do teste e o procedimento de cálculos se mantém inalterado. Em caso de redução dos volumes é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a leitura fotométrica. Volumes de amostra menores que 0,01 mL são críticos em aplicações manuais e devem ser usados com cautela porque aumentam a imprecisão da medição.

## Cálculos . Ver item Linearidade

Calcular as diferenças de absorbâncias para o Teste e o Calibrador:

$$\Delta A = A_2 - A_1$$

Frutosamina ( $\mu\text{mol/L}$ ) = ( $\Delta A$  Teste /  $\Delta A$  Calibrador) x Concentração do calibrador

### Exemplo

Absorbância do Teste

$$A_1 = 0,211 \quad A_2 = 0,252 \quad \Delta A \text{ Teste} = 0,041$$

Absorbância do calibrador

$$A_1 = 0,214 \quad A_2 = 0,275 \quad \Delta A \text{ Teste} = 0,061$$

Concentração do calibrador em uso = 359  $\mu\text{mol/L}$

Frutosamina ( $\mu\text{mol/L}$ ) = (0,041/0,061) x 359 = 241  $\mu\text{mol/L}$

Devido a grande reprodutibilidade que pode ser obtida com a metodologia, pode-se utilizar o método do fator.

Fator de calibração = Concentração do calibrador /  $\Delta A$  Calibrador

Frutosamina ( $\mu\text{mol/L}$ ) =  $\Delta A$  Teste x Fator

Fator de calibração = 359/0,061 = 5885

Frutosamina ( $\mu\text{mol/L}$ ) = 0,041 x 5885 = 241  $\mu\text{mol/L}$ .

**Calibração** . A concentração do calibrador é rastreável a um padrão proteico calibrado com amostra de polilisina glicada com glicose marcada com  $^{14}\text{C}^6$ .

### Calibrações manuais

Calibração de 2 pontos

Calibrador incluso (Ref. 1019.3)

### Sistemas automáticos

Calibração de 2 pontos;

Branco de reagente: água deionizada ou NaCl 150 mmol/L;

Calibrador incluso (Ref. 1019.3)

### Intervalo de calibrações

Deve-se calibrar o sistema semanalmente e nas seguintes situações:

Quando o controle interno da qualidade indicar;

Quando utilizar um novo lote de reagentes;

Quando utilizar um novo reagente de trabalho.

## Linearidade

O resultado da medição é linear entre 20  $\mu\text{mol/L}$  e 800  $\mu\text{mol/L}$ . Para valores maiores diluir a amostra com NaCl 150 mmol/L (0,85%), realizar nova medição e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

**Controle interno da qualidade** . O laboratório deve manter um programa de controle interno de qualidade que defina claramente os regulamentos aplicáveis, objetivos, procedimentos, critérios para especificação 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 no estabelecido pela *American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP)*.<sup>7</sup>

**Intervalo de referência**<sup>4,8</sup> . Estes valores devem ser utilizados apenas como orientação. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça, na população de animais atendidos, sua própria faixa de valores de referência.

### Frutosamina ( $\mu\text{mol/L}$ )

Caninos	274 - 382
Felinos	174 - 294
Equinos	235 - 332

## Características do desempenho<sup>6</sup>

**Exatidão** . Em duas amostras com concentrações de frutosamina iguais a 175 e 253  $\mu\text{mol/L}$  foi adicionada quantidade conhecida do analito, obtendo-se recuperação média de 102%. O erro sistemático proporcional médio estimado é igual a 5,1  $\mu\text{mol/L}$  para o nível de decisão de 256  $\mu\text{mol/L}$  (felinos) e 7,8  $\mu\text{mol/L}$  para o nível de decisão de 388  $\mu\text{mol/L}$  (caninos e equinos).

**Especificidade** . O método proposto foi comparado com um método similar utilizando 40 amostras com valores situados entre 33 e 775  $\mu\text{mol/L}$ . A comparação resultou na equação de regressão  $y = 1,029x - 1,346$  e um coeficiente de correlação ( $r$ ) igual a 0,998. É evidente uma correlação extremamente positiva entre os dois métodos, observando-se um erro sistemático de 2,3% para o nível de decisão 256  $\mu\text{mol/L}$  (felinos) e 2,6% para o nível de 388  $\mu\text{mol/L}$  (caninos e equinos).

### Repetitividade - imprecisão intraensaio

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	20	256	4,09	1,60
Amostra 2	20	388	3,24	0,84

### Reprodutibilidade - imprecisão total

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	20	256	4,73	1,85
Amostra 2	20	388	8,21	2,12

**Avaliação do erro total** . O cálculo do erro total foi realizado de acordo com o estabelecido pela *American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP)*<sup>7</sup> através da seguinte equação:

$$\text{Erro total} = 2 \times \text{Coeficiente de variação (\%)} + \text{Bias (\%)}$$

O erro total estimado no valor de 256  $\mu\text{mol/L}$  é igual a 3,72% e no valor de 380  $\mu\text{mol/L}$  é igual a 2,17%. Os resultados indicam que o método atende à especificação desejável pela ASVCP para o erro total desejável (<9,6%).<sup>7</sup>

**Sensibilidade metodológica** . Uma amostra de NaCl 150 mmol/L (0,85%) foi utilizada para calcular o limite de detecção do ensaio tendo sido encontrado um valor igual a 5,0 µmol/L, equivalente à média de 20 ensaios mais dois desvios-padrão. Verificou-se que o limite de detecção fotométrica é de 3,2 µmol/L correspondendo a uma absorvância igual a 0,001.

**Efeitos da diluição da matriz** . Uma amostra com valor igual a 658 µmol/L foi utilizada para avaliar a resposta do sistema às diluições da matriz com NaCl 150 mmol/L (0,85%). Usando diversos fatores de diluição foi encontrada recuperação média de 101%.

**Significado clínico** . A frutossamina é o nome genérico dado às proteínas glicadas proveniente da ligação da glicose sanguínea às proteínas plasmáticas. Esta glicação é dependente da concentração sérica de glicose e proteínas, e parece estar ligada especialmente à albumina em cães e às globulinas em gatos<sup>9</sup>. A dosagem da frutossamina reflete os níveis de glicose plasmática em uma ou duas semanas anteriores à coleta<sup>10</sup>. A mensuração da frutossamina é considerada o teste padrão ouro para a avaliação da glicemia em gatos por não sofrer influência da hiperglicemia decorrente do estresse (agudo ou crônico), muito comum em felinos.<sup>11</sup>

A elevação dos níveis da frutossamina ocorre na *Diabetes mellitus* e sua quantificação é essencial para monitorar a eficiência da insulinoaterapia<sup>4</sup>. Em cães e gatos, a concentração de frutossamina entre 350 - 400 µmol/L indica uma excelente resposta do animal à insulinoaterapia, enquanto que níveis de frutossamina superiores a 500 µmol/L indicam um controle glicêmico ineficiente.<sup>12</sup>

A redução da concentração de frutossamina pode ocorrer em casos de hipoglicemia persistente causada por neoplasia pancreática (insulinoma) e em gatos com hipertireoidismo<sup>4</sup>. Além disso, os níveis de frutossamina podem estar diminuídos na hipoproteinemia severa em gatos e hipoproteinemia associada à hypoalbuminemia severa em cães.<sup>4,9</sup>

## 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 ser 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.

## Referências

1. Baker JR, Metcalf PA, Johnson RN, Newman D, Rietz P. Clin Chem, v. 31, p.1550-1554, 1985.
2. Reusch CE, Liehs MR, HOYER M, Vochezer R. Fructosamine: A new parameter for diagnosis and metabolic control in Diabetic Dogs and Cats. Journal of Veterinary Internal Medicine, v.7, n.3, p.177 - 182, 1993.
3. Johnson RN, Metcalf PA, Baker JR. Clin Chem Acta, v. 127, p.87-95, 1983.
4. eClinpath - Cornell University College of Veterinary Medicine. Disponível em: < <http://www.eclinpath.com/>> (acesso em 06/2016).
5. Jensen AL. Serum fructosamine in canine diabetes mellitus. An initial study. Veterinary Research Communications, v. 16, n.1, p. 1-9, 1992.
6. Labtest: Dados de arquivo.
7. Harr KE, Flatland B, Nabity M, Freeman, KP. ASVCP guidelines: allowable total error guidelines for biochemistry. Veterinary Clinical Pathology, v. 42, n. 4, p. 424-436, 2013.
8. Beltrame OC, Dittrich RL, Medeiros NC, et al. Valores de referência da hemoglobina glicada e frutossamina em cães. Semina: Ciências Agrárias, v.35, n.4, p.1865-1870, 2014.
9. Reusch CE, Haberer, B. Evaluation of fructosamine in dogs and cats with hypo- or hyperproteinaemia, azotaemia, hyperlipidaemia and hyperbilirubinaemia. Veterinary Record, v.24, março, p.370-376, 2001.
10. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss, ML. Clinical biochemistry of Domestic Animals, 6a edição, Burlington: Academic Press, 2008,366-367.
11. Moraes LF, Thomazini CM, Takahira RK, Carvalho LR. Avaliação dos níveis de frutossamina em gatos sob estresse agudo e crônico. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 48, n. 5, p. 419-424, 2011.
12. Feldman EC, Nelson RW. Canine and Feline Endocrinology and Reproduction, 3a edição, St Louis: Saundersm 2004, p.510.

## Apresentação

Produto	Referência	Conteúdo	
Frutosamina Vet	1019-3/15	<b>R1</b>	3 X 9 mL
		<b>R2</b>	3 X 6 mL
		<b>CAL</b>	1 X 2 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.

**Estão disponíveis aplicações para sistemas automáticos e semiautomáticos.**

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

**Serviço de Apoio ao Cliente** | 0800 031 3411 (Ligação Gratuita)  
e-mail: [sac@labtest.com.br](mailto:sac@labtest.com.br)

Edição: Julho, 2016

Revisão: -

Ref.: 110123(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

	<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 Calibrador Calibrator Material		<b>Tóxico</b> Tóxico Poison
	<b>Material Calibrador</b> Material Calibrador 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 |