



# Fosfatase Alcalina

Vet

## Finalidade

Método cinético otimizado (DGKC e SSCC) a 405 nm, para a determinação de fosfatase alcalina.

## Significado Clínico

É uma das enzimas mais amplamente distribuídas pelo organismo. Consiste em um grupo de várias isoenzimas que hidrolisam fosfatos em pH alcalino – elas são encontradas principalmente nos ossos, fígado e parede intestinal. Níveis mais altos são encontrados em filhotes com alta atividade osteoblástica; após o fechamento dos discos epifisários são encontrados níveis menores, a maioria de origem hepática.

Quadros como o raquitismo, osteomalacia, hiperparatireoidismo, osteossarcoma, metástase óssea de carcinoma não esquelético e osteoartropatia craniomandibular podem produzir elevações moderadas a altas na atividade plasmática da ALP. Lesões localizadas às vezes não produzem mudanças visíveis em relação à faixa de normalidade.

A lesão hepática causa aumento moderado da atividade plasmática da ALP em todas as espécies. Isso tende a ser paralelo ao aumento de atividade de outras enzimas hepáticas. A ALP aumentada também acompanha o aumento de ALT em alguns gatos com hipertireoidismo.

No cão, a síndrome de Cushing está frequentemente associada à alta atividade plasmática de ALP, em parte devido à frequente presença de hepatopatia esteroide nesses animais, mas também pela produção de uma enzima específica de ALP pelo córtex adrenal.

A doença no trato biliar, especialmente a obstrução, causa um aumento maciço na atividade plasmática de ALP, podendo chegar em 50.000 U/L. Na prática, a doença do trato biliar pode ser distinguida pela marcante elevação de ALP sem alteração nas enzimas do parênquima hepático (em princípio) em muitos casos.

## Fundamento do método

A fosfatase alcalina (ALP ou monoésteres ortofosfórico fosfohidrolase, EC.3.1.3.1) hidrolisa ao p-nitrofenilfosfato (p-NFF), que não tem cor, produzindo fosfato e p-nitrofenol em pH alcalino. A velocidade da aparição do ânion p-nitrofenolato (amarelo) a 405 nm, é proporcional à atividade enzimática da amostra.

## Reagentes Fornecidos

**A. Reagente A:** solução de tampão DEA (dietanolamina).

**B. Reagente B:** solução contendo p-nitrofenil fosfato (p-NFF).

## Concentrações finais

DEA.....1,25 mmol/L, pH 10,2  
p-NFF.....50 mmol/L

## Instruções de Uso

**Reagentes Fornecidos:** prontos para uso. Podem ser utilizados separadamente ou como Reagente único, misturando 4 partes de Reagente A com 1 parte de Reagente B (ex: 4 mL Reagente A + 1 mL Reagente B).

## Indícios de instabilidade ou deterioração dos reagentes

Quando o espectrofotômetro for zerado com água destilada, leituras de absorvância do Reagente único (pré-misturado) superiores a 0,900 D.O., são indício de deterioração.

## Precauções

Os reagentes são para uso diagnóstico *in vitro* veterinário.

Utilizar os reagentes observando as precauções habituais de trabalho no laboratório de análises clínicas.

Todos os reagentes e amostras devem ser descartados conforme a legislação local vigente.

## Estabilidade e instruções de armazenamento

**Reagentes Fornecidos:** são estáveis sob refrigeração (2-8°C) até a data de vencimento indicada na embalagem. Uma vez abertos, não devem permanecer destampados nem fora do refrigerador por períodos prolongados. Evitar contaminações.

**Reagente único** (pré-misturado): é estável um mês sob refrigeração (2-8°C), a partir do momento de sua preparação.

## Amostra

Soro ou plasma com heparina

- Coleta: deve ser realizada de forma habitual.
- Aditivos: caso seja utilizado o plasma como amostra, recomenda-se o uso de heparina como anticoagulante.
- Estabilidade e instruções de armazenamento: empregar soro preferencialmente fresco. Caso o teste não seja realizado até 6 horas após a coleta, a amostra deve ser conservada a -20°C.

## Interferências

Não são observadas interferências por bilirrubina até 16 mg/dL, triglicerídeos até 1000 mg/dL e heparina até 50 UI/mL. Hemólise moderada (até 200 mg/dL) não produz interferência, no entanto, hemólise muito severa pode alterar os resultados.

## Material necessário (não fornecido)

- Espectrofotômetro;
- Micropipetas e pipetas capazes de medir os volumes indicados;
- Cubetas espectrofotométricas de faces paralelas.
- Banho-maria à temperatura indicada no procedimento e,
- Cronômetro.

## Condições da reação

- Comprimento de onda: 405 nm
  - Temperatura de reação: 37°C
  - Tempo de Reação: 3 minutos e 20 segundos.
  - Volume de amostra: 10µL
- Os volumes de Amostras e Reagente podem mudar proporcionalmente sem que variem os fatores de cálculo.

## Procedimento

### I - Técnica com reagente único

Em uma cubeta mantida a 37°C, colocar:

Reagente único	1,0 mL
Pré-incubar uns minutos. Após, acrescentar:	
Amostra	10 µL

Misturar imediatamente e disparar simultaneamente o cronômetro. Esperar 20 segundos e ler a absorvância inicial. Registrar a absorvância após 1, 2 e 3 minutos da primeira leitura. Determinar a diferença da média de Absorvância/min ( $\Delta A/\text{min}$ ), subtraindo cada leitura da anterior e calculando a média dos valores. Utilizar esta média para os cálculos.

### Cálculo dos resultados

Fosfatase alcalina (U/L) a 405 nm =  $\Delta A/\text{min} \times 5460$

### II- Técnica com reagentes separados

Em uma cuba mantida a 37°C, colocar:

Reagente A	1,0 mL
Amostra	10 µL
Pré-incubar uns minutos. Após, acrescentar:	
Reagente B	0,25 mL

Misturar imediatamente e disparar simultaneamente o cronômetro. Esperar 20 segundos e ler a absorvância inicial. Registrar a absorvância após 1, 2 e 3 minutos da primeira leitura. Determinar a diferença da média de Absorvância/min ( $\Delta A/\text{min}$ ), subtraindo cada leitura da anterior e calculando a média dos valores. Utilizar esta média para os cálculos.

### Cálculo dos Resultados

Fosfatase alcalina (U/L) a 405 nm =  $\Delta A/\text{min} \times 6812$  Exemplo:

(Os dados apresentados a seguir são ilustrativos)

	Amostra	Diferença	Média
Absorvância A1	0,458		
Absorvância A2	0,499	0,041	
Absorvância A3	0,543	0,044	
Absorvância A4	0,586	0,043	0,043

Utilizando Fator teórico / Técnica com reagentes separados:

Fosfatase Alcalina (U/L) =  $0,043 \times 6812 = 293$  U/L

Caso seja utilizado o calibrador Laborcal Vet:

Concentração da ALP no calibrador: 446 U/L

	Amostra	Diferença	Média
Absorvância A1	0,423		
Absorvância A2	0,488	0,065	
Absorvância A3	0,554	0,066	
Absorvância A4	0,619	0,065	0,065

Obtenção do fator de calibração:

$$\text{Fator} = \frac{[\text{ALP calibrador}]}{\Delta A/\text{min calibrador}} = \frac{446 \text{ U/L}}{0,065} = 6861$$

Fosfatase Alcalina (U/L) =  $\Delta A/\text{min}_{\text{amostra}} \times \text{Fator} = 0,043 \times 6861 = 295$  U/L



# Fosfatase Alcalina

## Vet

### Conversão de unidades ao sistema SI

ALP (U/L) x 0,017 = ALP (ukat/L)

### Método de Controle de Qualidade

Processar 2 níveis de um material de controle de qualidade (Laborcontrol Vet 1 e 2) com atividades conhecidas de fosfatase alcalina, com cada determinação.

### Valores de Referência

#### Espécie (U/L)

Espécie	Valor de Referência (U/L)
Canina	
Felina	
Bovino	
Equina	

Os valores de referência devem ser usados apenas como orientação. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça, na população de animais atendida, seus próprios valores de referência.

### Limitações do procedimento

Vide "Interferências".

Os anticoagulantes comuns, (tais como EDTA dissódico, oxalato, citrato ou fluoreto) produzem inibição da atividade de fosfatase alcalina.

O reagente pode obter uma coloração ainda em presença de pequenas quantidades de soluções de limpeza com base de hipoclorito. Assegure-se de enxaguar com água em abundância todo o material que esteja em contato com hipoclorito, incluindo as agulhas e conexões dos analisadores, quando for empregada a técnica automática.

### Desempenho

a) **Reprodutibilidade:** processando 20 determinações simultaneamente de uma amostra canina e outra equina com valores dentro do intervalo de referência, obteve-se o seguinte:

Amostra Canina:

Concentração	D.P.	C.V.
547,35	5,21	0,95
150,0	1,34	0,89

Amostra Equina:

Concentração	D.P.	C.V.
432,30	4,79	1,11
986,80	8,28	0,84

b) **Linearidade:** a reação é linear até 1.500 U/L. Para valores superiores, repetir a determinação anterior com diluição do soro 1/5 ou 1/10 com solução fisiológica. Corrigir os cálculos multiplicando pelo fator de diluição empregado.

c) **Limite de detecção:** a mínima mudança de atividade detectável de ALP que pode ser diferenciada de zero é 18 U/L.

### Parâmetros para analisadores automáticos

Para a programação consultar o manual de uso do analisador a ser utilizado.

Apresentação

2 x 48 mL **Reagente A**

2 x 12 mL **Reagente B**

(Cód. 1774114)

### Referências

- Bessey, O.A.; Lowry, O.H. y Brock, M. - J. Biol. Chem. 164, 231 (1946).
- Bowers, G.N. Jr. and Mc Comb, R.B. - Clin. Chem. 12:70 (1966).
- Mc Comb, R.B.; Bowers, G.N. Jr - Clin. Chem. 18/2:97 (1972).
- D.G.K.C. - Z. Clin. Chem. u. Klin. Biochem. 8: 658 (1970); 9: 464 (1971); 10: 182 (1972).
- S.S.C.C. - Scand. J. Clin. Lab. Invest. 33/4:291 (1974).
- I.F.C.C. - Clin. Chem. 22/3: 384 (1976).
- International Union of Biochemistry Nomenclature Committee - Clin. Chim. Acta 96/1-2: 157 (1979).
- Young, D.S. - Clin. Chem. 21/5: 246 D (1975).
- I.F.C.C. - Clin. Chim. Acta 87/3: 459F (1978).
- Demaría, I.; Setta, F.; Lorenzo, L. - Rev. Asoc. Bioq. Arg. 54/3 (1990).
- Schlebusch, H.; Rick, W.; Lang, H. and Knedel, M. - Dtsch. Med. Wschr. 99:765 (1974).
- Rick, W. - Klinische Chemie und Mikroskopie, p.294, 6th ed., Springer Verlag, Berlin (1990).
- NCCLS document "Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices", EP5-A (1999).
- NCCLS document "Evaluation of Linearity of Quantitative Analytical Methods", EP5-A (1986).
- Thrall, M. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária, 2ª ed. Guanabara koogan: Rio de Janeiro, 2015.

- González, F. H. D.; SILVA, S. C. Introdução a bioquímica clínica veterinária. Porto Alegre: UFRGS, 2003.

- Kerr, Morag G. Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária 2ª ed., Roca: São Paulo, 2003.

### Termo de garantia

Este Kit como um todo tem garantia de troca, desde que esteja dentro do prazo de validade e seja comprovado pelo Departamento Técnico da Laborlab Produtos para Laboratórios Ltda. que não houve falhas técnicas na execução e manuseio deste kit, assim como em sua conservação.

### SÍMBOLOS



Este produto preenche os requisitos da Diretiva Européia 98/79 CE para dispositivos médicos de diagnóstico "in vitro"



Representante autorizado na Comunidade Européia



Uso médico-diagnóstico "in vitro"



Conteúdo suficiente para <n> testes



Data de validade



Limite de temperatura (conservar a)



Não congelar



Risco biológico



Volume após da reconstituição



Conteúdo



Número de lote



Elaborado por:



Nocivo



Corrosivo / Caústico



Irritante



Consultar as instruções de uso



Calibrador



Controle



Controle Positivo



Controle Negativo



Número de catálogo



Laborlab Produtos para Laboratórios Ltda.

Estrada do Capão Bonito, 489

Guarulhos/SP – Brasil – CEP: 07263-010

CNPJ: 72.807.043/0001-94

Atendimento ao cliente:

+55(11) 2480-0529/+55(11) 2499-1277

[sac@laborlab.com.br](mailto:sac@laborlab.com.br)

[www.laborlab.com.br](http://www.laborlab.com.br)

Revisão 00

Agosto, 2020