



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 absorbância 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, triglicérides 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 absorbância inicial. Registrar a absorbância após 1, 2 e 3 minutos da primeira leitura. Determinar a diferença da média de Absorbância/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 absorbância inicial. Registrar a absorbância após 1, 2 e 3 minutos da primeira leitura. Determinar a diferença da média de Absorbância/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
Absorbância A1	0,458		
Absorbância A2	0,499	0,041	
Absorbância A3	0,543	0,044	
Absorbância A4	0,586	0,043	0,043

Utilizando Fator teórico / Técnica com reagentes separados:

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

Caso seja utilizado o calibrador Laborcal Vet:

Concentração da ALP no calibrador: 446 U/L

	Amostra	Diferença	Média
Absorbância A1	0,423		
Absorbância A2	0,488	0,065	
Absorbância A3	0,554	0,066	
Absorbância 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) = $\Delta A/\text{min}_{\text{amostra}} \times \text{Fator} = 0,043 \times 6861 = 295 \text{ U/L}$



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)

Canina	35 - 280
Felina	6 - 106

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. Assoc. Bioq. Arg. 54/3 (1990).
- Schlebush, 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

www.laborlab.com.br

Revisão 01

Março, 2021