



Acid and Prostatic Phosphatase

Finalidade

Método cinético para a determinação de fosfatases ácida total e prostática

Significado clínico

As fosfatases ácidas se encontram em quase todos os tecidos do organismo particularmente em altas quantidades na próstata, estômago, fígado, músculos, baço, eritrócitos e plaquetas. A variedade das isoenzimas podem-se diferenciar pelo pH ótimo, peso molecular e com a necessidade de aceleradores e inibidores. A fosfatase ácida prostática (PAP) constitui um valioso auxiliar no diagnóstico precoce do câncer prostático, considerado uma das formas neoplásicas de maior morbidade. A determinação cinética de PAP utilizando α -naftil fosfato como substrato tem demonstrado sensibilidade e especificidade apropriadas para a utilização no diagnóstico desta doença.

Aumento na atividade de fosfatase ácida total (ACP) foi demonstrado em algumas doenças hematológicas (leucemia mielocítica, trombocitopenia idiopática) e ósseas (doença de Paget, carcinoma ósseo), assim como em alguns tipos de câncer, doenças hepáticas (hepatite, icterícia obstrutiva), etc.

Fundamentos do método

A fosfatase ácida (ACP E.C.3.1.3.2.) hidrolisa o α -naftil fosfato a pH 5,2 liberando fosfato e α -naftol. Este último reage com diazo reagente presente no sistema (Fast Red TR) produzindo um pigmento amarelo, sendo que o aumento da absorvância lido a 405 nm é proporcional à atividade fosfatásica total (ACP) da amostra. Quando a atividade é medida em presença de tartrato, inibe-se a atividade da isoenzima prostática. A diferença entre as atividades de fosfatase ácida total (ACP) e da resistente ao tartrato (Fosfatase Ácida não Prostática/ACP-NP) corresponde à fração prostática (PAP).

Reagentes fornecidos

A. Reagente A: tampão citrato 0,1 mol/l, pH 5,2.

B. Reagente B: frascos contendo α -naftil fosfato 10 mmol/l e Fast Red TR 1,5 mmol/l.

C. Reagente C: solução de tartrato 135 mmol/l em tampão citrato 100 mmol/l, pH 5,2.

D. Reagente D: solução de ácido acético 0,7 mol/l.

Reagentes não fornecidos

Solução fisiológica (cloreto de sódio 9 g/l).

Instruções de uso

Fosfatase Ácida Total (FAT/ACP)

Reagente B; preparação: dissolver com o volume de Reagente A indicado no rótulo. Marcar no rótulo ACP.

Fosfatase Ácida não Prostática (FANP/ACP-NP)

Reagente B; preparação: dissolver com o volume de Reagente C indicado no rótulo. Marcar no rótulo ACP-NP.

Precauções

Os reagentes são para uso diagnóstico "in vitro".

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

Todos os reagentes e as amostras devem ser descartadas conforme à regulação local vigente.

Estabilidade e instruções de armazenamento

Reagentes Fornecidos: são estáveis sob refrigeração (2-10°C) até a data do vencimento indicada na embalagem. A exposição prolongada a temperatura ambiente pode produzir o deterioração do Reagente B.

Reagente B reconstituído: estável por 3 dias sob refrigeração (2-10°C) ou 24 horas sob temperatura ambiente (< 25°C).

Indícios de instabilidade ou deterioração dos reagentes

Quando as leituras a 405 nm do Reagente B reconstituído são maiores a 0,250 D.O. zerando o aparelho com água, são indício de deterioração do Reagente.

Amostra

Soro

a) Coleta: obter soro da maneira habitual. Não utilizar plasma.

A fosfatase ácida prostática é sumamente instável "in vitro" e ao pH do soro a temperatura ambiente pode perder até um 50% da atividade, em poucas horas. Porém, deve-se separar o soro do coágulo dentro de uma hora da obtenção, conservando-o refrigerado (2-10°C) até a hora de usar.

b) Aditivos: para evitar a inativação durante o armazenamento pode-se acidificar a amostra acrescentando 50 ul de Reagente D (acético 0,7 ml/l) por cada ml de soro.

c) Estabilidade e instruções de armazenamento: caso se utilize o conservante descrito em b) a amostra pode ser conservada sob refrigeração (2-10°C) durante vários dias sem perda significativa da atividade. Caso não utilizar este conservante proceder como se indica em a).

Interferências

Soro muito ictericos demonstram baixa recuperação da atividade enzimática pelo que seu uso deve ser evitado.

Não se observa interferência por lipemia até 600 mg/dl de triglicerídeos, nem hemoglobina até 100 mg/dl.

Os anticoagulantes interferem na reação, pelo que não se deve utilizar plasma na determinação.

Referência bibliográfica de Young para efeitos de drogas neste método.

Material necessário (não fornecido)

- Espectrofotômetro.

- Micropipetas e pipetas para medir os volumes indicados.

- Cubeta espectrofotométricas de faces paralelas.

- Cronômetro.

Condições de reação

- Comprimento de onda: 405 nm

- Temperatura da reação: 37°C

- Tempo de reação: 3 minutos

Procedimento

Em uma cubeta mantida a 37°C colocar:

	ACP	ACP-NP
Reagente B ACP	1 ml	-
Reagente B ACP-NP	-	1 ml

Preincubar uns minutos. Logo após adicionar:

Amostra	100 ul	100 ul

ACP: misturar e disparar simultaneamente o cronômetro. Após 5 minutos registrar a D.O. Ler posteriormente a absorvância cada minuto durante 3 minutos. Determinar a diferença da média da absorvância/minuto (ΔA /min) subtraindo cada leitura da anterior e tirando a média dos valores. Utilizar esta média para os cálculos (ΔA_1 /min).
ACP-NP: proceder da mesma maneira que para ACP. Obtém-se assim ΔA_2 /min.

Cálculo dos resultados

Fosfatase Ácida Total (ACP) = ΔA_1 /min x 743 = (U/I₁)

Fosfatase Ácida no Prostática (ACP-NP) = ΔA_2 /min x 743 (U/I₂)

Fosfatase Ácida Prostática (PAP) (U/I) = U/I₁ - U/I₂

Exemplo:

(Os dados apresentados a seguir são ilustrativos)

Fosfatase Ácida Total

	Amostra	Diferença	Promédio
Absorvância A1	0,249		
Absorvância A2	0,277	0,028	
Absorvância A3	0,302	0,025	
Absorvância A4	0,329	0,027	0,027

Utilizando Fator teórico (37°C)

ACP (U/I) = 0,027 x 743 = 20,1 U/I

Fosfatase Ácida não Prostática

	Amostra	Diferença	Promédio
Absorvância A1	0,232		
Absorvância A2	0,239	0,007	
Absorvância A3	0,247	0,008	
Absorvância A4	0,256	0,009	0,008

Utilizando Fator teórico (37°C)

ACP-NP (U/I) = 0,008 x 743 = 5,9 U/I

PAP (U/I) = 20,1 U/I - 5,9 U/I = 14,2 U/I

Valores de referência

Fosfatase Ácida Total (ACP): < 9 U/l (a 37°C)

Fosfatase Ácida Prostática (PAP): < 3,5 U/l (a 37°C)

A atividade de ACP é muito pouca nos homens saudáveis e quase nada na mulher, por tal motivo os valores esperados ficam no limite do erro instrumental ou muito perto ao limite de detecção do sistema.

No entanto recomenda-se que cada laboratório estabeleça seus próprios valores de referência.

Limitações do procedimento

- Vide "Interferências".

- As enzimas são sensíveis à ação de certos contaminantes e venenos enzimáticos (metais pesados, cianetos, tensoativos, etc.) pelo que se recomenda manter muita precaução na limpeza do material utilizado na obtenção de amostras e na determinação.

- Alterações iatrogênicas: existem alguns medicamentos que podem afetar os valores plasmáticos de PAP, ao igual que a massagem, cateterismo e outras manipulações prostáticas pelo que é conveniente perguntar ao paciente ou a seu médico em referência à medicação, tratamento ou procedimento diagnóstico a que está sujeito o paciente.

- O diagnóstico clínico não se deve realizar tomando em conta o resultado de um único ensaio. Deve-se integrar os dados clínicos e de laboratório.

Método de controle de qualidade

Processar dois níveis de um material de controle de qualidade (**Laborcontrol 1** e **Laborcontrol 2** da Laborlab) com atividades conhecidas de fosfatases ácida total e prostática.

Desempenho

a) Reprodutibilidade: aplicando o protocolo EP-15A do CLSI, analisaram-se dois níveis de atividade, cada um por quadruplicado durante 5 dias. Com os dados obtidos, calcularam-se as precisões intra-ensaio e total.

Fosfatase Ácida Total

Precisão intra-ensaio

Nível	D.P.	C.V.
23,7 U/l	± 0,400 U/l	1,7 %
45,2 U/l	± 0,575 U/l	1,3 %

Precisão total

Nível	D.P.	C.V.
23,7 U/l	± 0,480 U/l	2,0 %
45,2 U/l	± 0,872 U/l	1,9 %

Fosfatase Ácida Não Prostática

Precisão intra-ensaio

Nível	D.P.	C.V.
11,6 U/l	± 0,307 U/l	2,7 %
24,5 U/l	± 0,718 U/l	2,9 %

Precisão total

Nível	D.P.	C.V.
11,6 U/l	± 0,351 U/l	3,0 %
24,5 U/l	± 0,776 U/l	3,2 %

b) Linearidade: a reação é linear até 74 U/l ($\Delta A/\text{min} = 0,100 \text{ D.O.}$). Para valores superiores, repetir a determinação com amostra diluída (0,1 ml amostra + 0,2 ml solução fisiológica), multiplicando o resultado obtido por 3.

c) Limite de detecção: a mudança mínima de atividade detectável é 0,51 U/l para a fosfatase ácida total e 0,48 U/l para a fosfatase ácida não prostática.

Apresentação

- 1 x 40 ml **Reagente A**
 - 20 x 2 ml **Reagente B**
 - 1 x 40 ml **Reagente C**
 - 1 x 5 ml **Reagente D**
- (Cód. 1770470)

Referência

- Hillmann, G.Z. - Klin. Chem. Klin. Biochem. 9:273 (1971).
- Skelley, D.S. - Ligand Rev. 2/1:43 (1980).
- Shaw, L.M.; Brummund, W.; Dorio, R.J. - Am. J. Clin. Pathol. 68/1:57 (1977).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4th ed., (2001)
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (ex-NCCLS) - Protocols EP 15A, 2001 / EP 17A, (2004).
- Junge, W.; Thormeyer, I.; Schlottmann A. et al - 3rd Alpe-Adria Congress on Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, September 7-9 (1994).

SÍMBOLOS



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



Representante autorizado na Comunidade Europeia



Uso médico-diagnóstico "in vitro"



Conteúdo suficiente para <n> testes



Data de validade



Limite de temperatura (conservar a)



Não congelar



Risco biológico



Volume após a 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

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.



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