



Fosfatasa Acida

Total y Prostática cinética

Método cinético para la determinación de fosfatasas
ácida total y prostática

SIGNIFICACION CLINICA

Las fosfatasas ácidas se encuentran presentes en casi todos los tejidos del organismo, siendo particularmente altas las cantidades de estas enzimas en próstata, estómago, hígado, músculo, bazo, eritrocitos y plaquetas. Las distintas isoenzimas se diferencian entre sí por su pH óptimo, peso molecular, y requerimientos de activadores e inhibidores. La fosfatasa ácida prostática (PAP) constituye un valioso auxiliar en el diagnóstico precoz de cáncer prostático, una de las formas neoplásicas de mayor morbilidad. La determinación de la actividad enzimática de PAP usando α -naftil fosfato como sustrato ha mostrado sensibilidad y especificidad adecuadas para su utilización en el diagnóstico de esta enfermedad.

Se encuentran actividades elevadas de Fosfatasa ácida total (ACP) en algunas enfermedades hematológicas (leucemia mielocítica, trombocitopenia idiopática) y óseas (enfermedad de Paget, carcinoma óseo), así como en algunos tipos de cáncer, enfermedades hepáticas (hepatitis, ictericia obstructiva), etc.

FUNDAMENTOS DEL METODO

La fosfatasa ácida (ACP EC 3.1.3.2.) hidroliza el α -naftil fosfato a pH 5,2 con liberación de fosfato y α -naftol. El naftol reacciona a su vez con un diazorreactivo presente en el sistema (Fast Red TR) produciendo un pigmento amarillo, de modo que el aumento de la absorbancia, leído a 405 nm, es proporcional a la actividad de fosfatasa ácida total (ACP) de la muestra. Cuando se mide la actividad en presencia de tartrato, se inhibe la actividad de la isoenzima prostática. La diferencia entre las actividades de fosfatasa ácida total (ACP) y de la resistente al tartrato (Fosfatasa Acida no Prostática/ACP-NP) corresponde a la fracción prostática (PAP).

REACTIVOS PROVISTOS

- A. Reactivo A:** buffer citrato 0,1 mol/l, pH 5,2.
B. Reactivo B: viales conteniendo α -naftil fosfato 10 mmol/l y Fast Red TR 1,5 mmol/l.
C. Reactivo C: solución de tartrato 135 mmol/l en buffer citrato 100 mmol/l, pH 5,2.
D. Reactivo D: solución de ácido acético 0,7 mol/l.

REACTIVOS NO PROVISTOS

Solución fisiológica (cloruro de sodio 9 g/l).

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Fosfatasa Acida Total (FAT/ACP)

Reactivo B; preparación: disolver con el volumen de Reactivo A indicado en el rótulo. Marcar en el rótulo ACP.

Fosfatasa Acida no Prostática (FANP/ACP-NP)

Reactivo B; preparación: disolver con el volumen de Reactivo C indicado en el rótulo. Marcar en el rótulo ACP-NP.

PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro". Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de análisis clínicos. Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Reactivos Provistos: son estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. La exposición prolongada a temperatura ambiente puede deteriorar el Reactivo B.

Reactivo B reconstituido: estable 3 días refrigerado (2-10°C) o 24 horas a temperatura ambiente (< 25°C).

INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Cuando las lecturas a 405 nm, del Reactivo B reconstituido, son mayores a 0,250 D.O., llevando el aparato a cero con agua, son indicio de deterioro del Reactivo.

MUESTRA

Suero

a) Recolección: obtener suero de la manera usual. No utilizar plasma. La fosfatasa ácida prostática es sumamente inestable "in vitro" y al pH del suero a temperatura ambiente puede perderse hasta un 50% de actividad en pocas horas. Por lo tanto debe separarse el suero del coágulo dentro de una hora de la extracción, conservándolo refrigerado (2-10°C) hasta el momento de usar.

b) Aditivos: para evitar la inactivación durante el almacenamiento puede acidificarse la muestra agregando 50 ul de Reactivo D (acético 0,7 mol/l) por cada ml de suero.

c) Sustancias interferentes conocidas:

- Sueros con marcada ictericia muestran baja recuperación de la actividad enzimática por lo que su uso debe evitarse.
- No se observa interferencia por lipemia hasta 600 mg/dl de triglicéridos, ni hemoglobina hasta 100 mg/dl.
- Los anticoagulantes interfieren en la reacción por lo que no debe emplearse plasma en la determinación.

Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: si

se emplea el conservador descrito en b) la muestra puede conservarse refrigerada (2-10°C) durante varios días sin pérdida significativa de la actividad. De lo contrario, proceder como se describe en a).

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Espectrofotómetro.
- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados.
- Cubetas espectrofotométricas de caras paralelas.
- Cronómetro.

CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda: 405 nm
- Temperatura de reacción: 37°C
- Tiempo de reacción: 3 minutos

PROCEDIMIENTO

En una cubeta mantenida a 37°C colocar:

	ACP	ACP-NP
Reactivo B ACP	1 ml	-
Reactivo B ACP-NP	-	1 ml
Preincubar unos minutos. Luego agregar:		
Muestra	100 ul	100 ul

ACP: mezclar y disparar simultáneamente el cronómetro. A los 5 minutos registrar la D.O. Leer posteriormente la absorbancia cada minuto durante 3 minutos. Determinar la diferencia promedio de absorbancia/minuto ($\Delta A_1/\text{min}$) restando cada lectura de la anterior y promediando los valores. Utilizar este promedio para los cálculos ($\Delta A_1/\text{min}$).
ACP-NP: proceder de la misma manera que para ACP. Se obtiene el $\Delta A_2/\text{min}$.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

Fosfatasa Acida Total (ACP) = $\Delta A_1/\text{min} \times 743 = (U/l_1)$

Fosfatasa Acida no Prostática (ACP-NP) = $\Delta A_2/\text{min} \times 743 = (U/l_2)$

Fosfatasa Acida Prostática (PAP) (U/l) = $U/l_1 - U/l_2$

VALORES DE REFERENCIA

Fosfatasa Acida Total (ACP): < 9 U/l (a 37°C)

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

La actividad de ACP es muy escasa en el hombre sano y casi nula en la mujer, de modo que los valores esperados se encuentran en el límite del error instrumental o muy cercanos al límite de detección del sistema. No obstante se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.
- Las enzimas son sensibles a la acción de ciertos contaminantes y venenos enzimáticos (metales pesados, cianuros, tensioactivos, etc.) por lo que se recomienda extremar las precauciones en la limpieza del material empleado en la

extracción de muestras y en la determinación.

- Alteraciones iatrogénicas: existen algunos medicamentos que pueden afectar los valores plasmáticos de PAP, así como el masaje, cateterismo y otras manipulaciones prostáticas por lo que es conveniente interrogar al paciente o al médico tratante sobre toda medicación, tratamiento o procedimiento diagnóstico a que esté sujeto el paciente.
- El diagnóstico clínico no debe realizarse teniendo en cuenta el resultado de un único ensayo, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

METODO DE CONTROL DE CALIDAD

Procesar con cada determinación, dos niveles de un material de control de calidad (**Standatrol S-E 2 niveles**) con actividades conocidas de fosfatasa ácida total y prostática.

PERFORMANCE

a) Reproducibilidad: se aplicó el protocolo EP15A del CLSI. Se analizaron dos niveles de actividad, cada uno por cuadruplicado durante 5 días, en analizador automático. Con los datos obtenidos, se calculó la precisión intraensayo y total.

Fosfatasa Acida Total

Precisión Intraensayo

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

Precisión Total

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

Fosfatasa Acida No Prostática

Precisión Intraensayo

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

Precisión Total

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

b) Linealidad: la reacción es lineal hasta 74 U/l ($\Delta A/\text{min} = 0,100 \text{ D.O.}$). Para valores superiores repetir la determinación con muestra diluida (0,1 ml muestra + 0,2 ml solución fisiológica), multiplicando el resultado obtenido por 3.

c) Límite de detección: la mínima actividad detectable es 0,51 U/l para la fosfatasa ácida total y 0,48 U/l para la fosfatasa ácida no prostática.

PRESENTACION

- 1 x 40 ml Reactivo A
- 20 x 2 ml Reactivo B
- 1 x 40 ml Reactivo C
- 1 x 5 ml Reactivo D (Cód. 1351402)

- 1 x 40 ml Reactivo A
- 20 x 2 ml Reactivo B
- 1 x 40 ml Reactivo C
- 1 x 5 ml Reactivo D
(Cód. 1009669)


- 1 x 40 ml Reactivo A
- 20 x 2 ml Reactivo B
- 1 x 40 ml Reactivo C
- 1 x 5 ml Reactivo D
(Cód. 1009922)*


BIBLIOGRAFIA


- 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

Los siguientes símbolos se utilizan en todos los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab.


 Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"

 Representante autorizado en la Comunidad Europea

 Uso diagnóstico "in vitro"

 Contenido suficiente para <n> ensayos


 Fecha de caducidad


 Límite de temperatura (conservar a)


 No congelar

 Riesgo biológico


 Volumen después de la reconstitución

 Contenido


 Número de lote


 Elaborado por:

 Nocivo

 Corrosivo / Cáustico

 Irritante


 Consultar instrucciones de uso

 Calibrador

 Control

 Control Positivo

 Control Negativo

 Número de catálogo



Fosfatasa Ácida

Total y Prostática cinética

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 absorbância 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) Substâncias interferentes conhecidas:

- Soro muito icterícos 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.

d) 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).

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 absorbância cada minuto durante 3 minutos. Determinar a diferença da média da absorbância/minuto ($\Delta A_1/\text{min}$) subtraindo cada leitura da anterior e tirando a média dos valores. Utilizar esta média para os cálculos ($\Delta A_1/\text{min}$).
ACP-NP: proceder da mesma maneira que para ACP. Obtém-se assim $\Delta A_2/\text{min}$.

CÁLCULO DOS RESULTADOS

Fosfatase Ácida Total (ACP) = $\Delta A_1/\text{min} \times 743 = (U/l_1)$

Fosfatase Ácida no Prostática (ACP-NP) = $\Delta A_2/\text{min} \times 743 (U/l_2)$

Fosfatase Ácida Prostática (PAP) (U/l) = $U/l_1 - U/l_2$

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 Substâncias interferentes conhecidas em AMOSTRA.
- As enzimas são sensíveis à ação de certos contaminantes e venenos enzimáticos (metais pesados, cianetos, tensioativos, 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 com cada determinação, dois níveis de um material de controle de qualidade (**Standatrol S-E 2 níveis**) com atividades conhecidas de fosfatases ácida total e prostática.

PERFORMANCE

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 ($\Delta A/\text{min} = 0,100$ 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. 1351402)

- 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. 1009669)


- 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. 1009922)*





















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

Os seguintes símbolos são utilizados nos kits de reagentes para diagnóstico da Wiener lab.

 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



Fosfatasa Acida

Total y Prostática cinética

Colorimetric method for the determination of acid phosphatase and prostatic acid phosphatase

SUMMARY

Acid phosphatases are present in almost all body tissues, and the highest levels are found specially high in prostate, stomach, liver, muscle, spleen, erythrocytes, and platelets. The various isoenzymes differentiate each other by their optimal pH, molecular weight, activators and inhibitors.

Prostatic acid phosphatase (PAP) is a valuable method for the diagnosis of prostate cancer in an early stage, one of the neoplastic forms of higher levels of morbidity. PAP enzymatic activity using α -naphthyl phosphate as substrate, has shown adequate sensitivity and specificity for the diagnosis of prostate cancer.

Increases in the total acid phosphatase (ACP) activity have been detected in some hematological diseases (myelocytic leukemia, idiopathic thrombocytopenia) and bone diseases (Paget disease, bone carcinoma), as well as some types of cancer, hepatic diseases (hepatitis, obstructive jaundice), etc.

PRINCIPLE

The acid phosphatase (ACP EC 3.1.3.2.) hydrolyzes the α -naphthyl phosphate at pH 5.2 releasing phosphate and α -naphthol. Naphtol reacts with a diazo reagent (Fast Red TR) yielding a yellow pigment. Thus, the absorbance measured at 405 nm increases and it is proportional to the total acid phosphatase (ACP) levels in the sample. When the activity is measured in presence of tartrate, the prostatic isoenzyme activity is inhibited. The difference among the diverse activities of total acid phosphatase (ACP) and the one tartrate resistant (Non-Prostatic Acid Phosphatase (ACP-NP) corresponds to prostatic fraction (PAP).

PROVIDED REAGENTS

- A. Reagent A:** 0.1 mol/l citrate buffer, pH 5.2.
B. Reagent B: vials containing 10 mmol/l α -naphthyl phosphate and 1.5 mmol/l Fast Red TR.
C. Reagent C: 135 mmol/l tartrate solution in 100 mmol/l citrate buffer, pH 5.2.
D. Reagent D: 0.7 mol/l acetic acid solution.

NON-PROVIDED REAGENTS

Saline solution (9 g/l sodium chloride).

INSTRUCTIONS FOR USE

Total Acid Phosphatase (ACP)

Reagent B; preparation: dissolve with Reagent A as indicated volume in the label. Label ACP.

Non-Prostatic Acid Phosphatase (ACP-NP)

Reagent B; preparation: dissolve with Reagent C volume as indicated in the label. Label ACP-NP.

WARNINGS

Reagents are for "in vitro" diagnostic use.

Use the reagents according to the working procedures for clinical laboratories.

The reagents and samples should be discarded according to the local regulations in force.

STABILITY AND STORAGE INSTRUCTIONS

Provided Reagents: stable at 2-10°C until their expiration date stated on the box. Room temperature exposure for extended periods of time may deteriorate Reagent B.

Reconstituted Reagent B: stable for up to 3 days at 2-10°C or for up to 24 hours at room temperature (< 25°C).

INSTABILITY OR DETERIORATION OF REAGENTS

If O.D. readings of Reagent B at 405 nm are above 0.250, it is an indicator of Reagent deterioration.

SAMPLE

Serum

a) Collection: obtain serum in the usual way. Do not use plasma. Prostatic acid phosphatase is extremely unstable "in vitro" and at room temperature, due to serum pH, enzymatic activity could decrease up to 50% in a few hours. Therefore, serum should be separated from clot within one hour from collection and stored at 2-10°C.

b) Additives: to avoid inactivation during storage acidify the sample adding 50 ul Reagent D (0.7 mol/l acetic) per 1 ml of serum.

c) Known interfering substances:

- Avoid the use of sera with evident jaundice because the enzymatic activity has low recovery.
- No interferences have been observed with lipemia up to 600 mg/dl triglycerides, or hemoglobin up to 100 mg/dl.
- Avoid the use of plasma, anticoagulants interfere in the reaction.

Refer to Young, D.S. under references for drugs' effect on the present method.

d) Stability and storage instructions: if the preservative detailed in b) is used, sample may be stored at 2-10°C for several days without significant activity loss. Otherwise, proceed as described in a).

REQUIRED MATERIAL (non-provided)

- Spectrophotometer.
- Micropipettes and pipettes for measuring stated volumes.
- Square spectrophotometric cuvettes.
- Stopwatch.

ASSAY CONDITIONS

- Wavelength: 409 nm
- Reaction temperature: 37°C
- Reaction time: 3 minutes

PROCEDURE

In a cuvette at 37°C, place:

	ACP	ACP-NP
Reagent B ACP	1 ml	-
Reagent B ACP-NP	-	1 ml

Preincubate for a few minutes. Then add:

Sample	100 ul	100 ul
--------	--------	--------

ACP: mix and simultaneously start stopwatch. At 5 minutes measure O.D. Then read absorbance every minute during 3 minutes. Determine average absorbance/minute ($\Delta A/\text{min}$) subtracting each reading from the previous one and averaging values. Use this mean for calculations ($\Delta A_1/\text{min}$).

ACP-NP: proceed as indicated for ACP. $\Delta A_2/\text{min}$ is obtained.

CALCULATIONS

Total Acid Phosphatase (ACP) = $\Delta A_1/\text{min} \times 743 = (U/l_1)$

Non-Prostatic Acid Phosphatase (ACP-NP) =

$\Delta A_2/\text{min} \times 743 = (U/l_2)$

Prostatic Acid Phosphatase (PAP) (U/l) = $U/l_1 - U/l_2$

REFERENCE VALUES

Total Acid Phosphatase (ACP): < 9 U/l (at 37°C)

Prostatic Acid Phosphatase (PAP): < 3.5 U/l (at 37°C)

ACP activity is rare in healthy men and almost absent in women. Thus, expected values are within the limit of instrument error or very close to the system's detection limit. Nonetheless, it is recommended that each laboratory establish its own reference values.

PROCEDURE LIMITATIONS

- See Known interfering substances in SAMPLE.
- The enzymes are sensitive to the action of certain contaminants and enzymatic poisons (heavy metals, cyanides, surfactants, etc.). Thus, it is recommended to maintain strict precautions when cleaning the material used in sample collection and determination.
- Iatrogenic alterations: some medicines may affect the PAP plasma values, as well as massage, catheterization, and other prostate manipulations. Therefore, it is convenient to ask the patient or the physician about the medication,

treatment or diagnosis procedure to which the patient is subjected.

- Clinical diagnosis should not be performed based on the result of a single assay, but it should incorporate clinical and laboratory data.

QUALITY CONTROL METHOD

Each time the test is performed, analyze two levels of a quality control material (**Standatrol S-E 2 niveles**) with known total and prostatic acid phosphatases activity.

PERFORMANCE

a) Reproducibility: CLSI protocol EP15A was applied. Two activity levels were analyzed, in replicates of four, during 5 days, using autoanalyzer. With the obtained data, total and intra-assay precision were calculated.

Total Acid Phosphatase

Intra-assay precision

Level	S.D.	C.V.
23.7 U/l	± 0.400 U/l	1.7 %
45.2 U/l	± 0.575 U/l	1.3 %

Total precision

Level	S.D.	C.V.
23.7 U/l	± 0.480 U/l	2.0 %
45.2 U/l	± 0.872 U/l	1.9 %

Non-Prostatic Acid Phosphatase

Intra-assay precision

Level	S.D.	C.V.
11.6 U/l	± 0.307 U/l	2.7 %
24.5 U/l	± 0.718 U/l	2.9 %

Total precision

Level	S.D.	C.V.
11.6 U/l	± 0.351 U/l	3.0 %
24.5 U/l	± 0.776 U/l	3.2 %

b) Linearity: reaction is linear up to 74 U/l ($\Delta A/\text{min} = 0.100$ O.D.). For higher values repeat determination with diluted sample (0.1 ml sample + 0.2 ml saline solution), multiplying the obtained result by 3.

c) Detection limit: the minimum detectable change of total acid phosphatase activity will be 0.51 U/l, and 0.48 U/l for non-prostatic acid phosphatase.

WIENER LAB. PROVIDES

- 1 x 40 ml Reagent A
- 20 x 2 ml Reagent B
- 1 x 40 ml Reagent C
- 1 x 5 ml Reagent D (Cat. 1351402)

- 1 x 40 ml Reagent A
- 20 x 2 ml Reagent B
- 1 x 40 ml Reagent C
- 1 x 5 ml Reagent D (Cat. 1009669)


- 1 x 40 ml Reagent A
 - 20 x 2 ml Reagent B
 - 1 x 40 ml Reagent C
 - 1 x 5 ml Reagent D
- (Cat. 1009922)*

REFERENCES

- 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).


SYMBOLS

The following symbols are used in the packaging for Wiener lab. diagnostic reagents kits.

 This product fulfills the requirements of the European Directive 98/79 EC for "in vitro" diagnostic medical devices

 Authorized representative in the European Community

 "In vitro" diagnostic medical device


 Contains sufficient for <n> tests

 Use by


 Temperature limitation (store at)

 Do not freeze

 Biological risks


 Volume after reconstitution

 Contents


 Batch code

 Manufactured by:

 Harmful

 Corrosive / Caustic

 Irritant

 Consult instructions for use

 Calibrator

 Control

 Positive Control

 Negative Control

 Catalog number



Fosfatasa Acida

Total y Prostática cinética

Kolorymetryczna metoda do oznaczania kwaśnej fosfatazy i kwaśnej fosfatazy sterczowej

Nr kat. 1351402
Nr kat. 1009669
Nr kat. 1009922

WSTĘP

Kwaśna fosfatasa jest enzymem obecnym w większości tkanek. Największą jej aktywność obserwuje się w prosta- cie, żołądku, wątrobie, mięśniach, śledzionie, erytrocytach i płytkach. Poszczególne izoenzymy charakteryzują się właściwym dla nich optymalnym pH, ciężarem cząsteczkowym, inhibitorami i aktywatorami aktywności.

Kwaśna fosfatasa sterczowa (Prostatic acid phosphatase, PAP) jest cenną metodą w diagnostyce wczesnego stadium raka prostaty, choroby rozrostowej o wysokiej śmiertelności. Wykazano dużą czułość i specyficzność oznaczenia aktywności enzymatycznej PAP, przy pomocy fosforanu α -naftyłu jako substratu, w diagnostyce tej choroby.

Wzrost całkowitej aktywności kwaśnej fosfatazy obserwowano również w niektórych chorobach hematologicznych (białaczka mielocytowa, idiopatyczna trombocytopenia) oraz chorobach kości (choroba Pageta, nowotwory kości), jak również w niektórych nowotworach, chorobach wątroby (zapalenie, żółtaczka zastoinowa), itp.

ZASADA DZIAŁANIA

Kwaśna fosfatasa (ACP EC 3.1.3.2.) hydrolizuje fosforan α -naftyłu w pH 5,2 uwalniając fosforan i α -naftol. Naftol reaguje z odczynnikiem diazo w układzie (Fast Red TR) tworząc żółty barwnik co wiąże się ze wzrostem absorbancji. Odczyt przy długości fali 405 nm jest proporcjonalny do całkowitej fosfatazy kwaśnej (acid phosphatase, ACP) w badanym materiale. Przy pomiarze w obecności winianu aktywność izoenzymu sterczowego jest hamowana. Różnica pomiędzy aktywnością całkowitą kwaśnej fosfatazy i fosfatazy odpornej na winian (niesterczowa kwaśna fosfatasa (Non-Prostatic Acid Phosphatase, ACP-NP) odpowiada frakcji sterczowej (PAP).

DOSTARCZANE ODCZYNNIKI

- A. Odczynnik A:** 0,1 mol/l bufor cytrynianowy, pH 5,2.
B. Odczynnik B: fiołki zawierające 10 mmol/l fosforanu α -napftyłu oraz 1,5 mmol/l Fast Red TR.
C. Odczynnik C: 135 mmol/l roztworu winianu w 100 mmol/l buforu cytrynianu, pH 5,2.
D. Odczynnik D: 0,7 mol/l roztwór kwasu octowego.

NIEDOSTARCZANE ODCZYNNIKI

Sól fizjologiczna (9 g/l chlorek sodu).

INSTRUKCJA UŻYCIA

Całkowita kwaśna fosfatasa

(Total Acid Phosphatase, ACP)

Odczynnik B; przygotowanie: dodać wskazaną na etykiecie objętość odczynnika A, rozpuścić i oznakować ACP.

Niesterczowa kwaśna fosfatasa

(Non-Prostatic Acid Phosphatase, ACP-NP)

Odczynnik B; przygotowanie: dodać wskazaną na etykiecie objętość odczynnika C, rozpuścić i oznaczyć ACP-NP.

OSTRZEŻENIA

Odczynnik diagnostyczny do zastosowania "in vitro". Stosować odczynniki zgodnie z procedurami dla laboratoriów klinicznych. Odczynniki i materiał badany odrzucać zgodnie z lokalnymi przepisami.

TRWAŁOŚĆ I WARUNKI PRZECHOWYWANIA

Dostarczane odczynniki: trwałe w lodówce w (2-10°C) do końca daty ważności umieszczonej na opakowaniu. Długi czas przechowywania w temperaturze pokojowej może pogorszyć jakość Odczynnika B.

Rozpuszczony Odczynnik B: trwały do 3 dni w lodówce (2-10°C) lub przez 24 godziny w temperaturze pokojowej (<25°C).

BRAK TRWAŁOŚCI I POGORSZENIE JAKOŚCI ODCZYNNIKÓW

Odczyty rozpuszczonego odczynnika B powyżej 0.250 O.D. przy długości fali 405 nm i ustawieniu aparatu na zero na wodzie, wskazują na pogorszenie jakości odczynnika.

MATERIAŁ BADANY

Surowica

a) Pobranie: pobrać surowicę w klasyczny sposób. Nie używać osocza. Kwaśna fosfatasa sterczowa jest dramatycznie nietrwała "in vitro" w pH surowicy krwi i temperaturze pokojowej. Traci do 50% aktywności w ciągu kilku godzin dlatego należy oddzielić surowicę od skrzepu w ciągu godziny od pobrania i przechowywać w lodówce (2-10°C) do momentu zastosowania.

b) Substancje dodatkowe: zapobiegać inaktywacji próbek w trakcie przechowywania poprzez zakwaszenie materiału badanego 50 μ l Odczynnika D (0,7 mol/l kwasu octowego) na każdy 1 ml surowicy krwi.

c) Znane interakcje:

- Unikać zastosowania surowicy krwi z widoczną hiperbilirubinemią, która przyczynia się do niskiego odzysku aktywności enzymatycznej.
- Nie obserwowano wpływu lipemii do poziomu trójglicerydów 600 mg/dl i hemoglobina do 100 mg/dl.
- Ze względu na interakcje z antykoagulantami nie stosować osocza do oznaczeń.

Zobacz źródło: Young, D.S. w sprawie wpływu leków w tej metodzie.

d) Trwałość i instrukcja przechowywania: jeżeli zastosowano środki konserwujące wymienione w b) materiał badany może być przechowywany w lodówce (2-10°C) przez kilka dni bez znacznej utraty aktywności. W przeciwnym razie postępować zgodnie z opisem a).

WYMAGANE MATERIAŁY I SPRZĘT (niedostarczane)

- Spektrofotometr.
- Mikropipety lub pipety do pomiaru określonej objętości.
- Kwadratowe kuwety do spektrofotometru.
- Stoper.

WARUNKI DLA PRZEPROWADZENIA TESTU

- Długość fali: 409 nm
- Temperatura reakcji: 37°C
- Czas reakcji: 3 minuty

PROCEDURA

W kuwecie o temp. 37°C, umieścić:

	ACP	ACP-NP
Odczynnik B ACP	1 ml	-
Odczynnik B ACP-NP	-	1 ml

Inkubować wstępnie przez kilka minut, a następnie dodać:

Materiał	100 ul	100 ul
ACP:		
ACP-NP:		

ACP: Wymieszać i równocześnie włączyć stoper. W 5 minucie zapisać O.D. Następnie odczytywać co minutę w ciągu 3 minut. Oznaczyć średnią różnicę absorbancji/minutę ($\Delta A_1/\text{min}$) odejmując każdy odczyt od poprzedniego i uśredniając wartości. Zastosować tę średnią do obliczeń ($\Delta A_1/\text{min}$).

ACP-NP: postępować jak wskazano dla ACP. Otrzymać $\Delta A_2/\text{min}$.

OBLICZENIA

Całkowita kwaśna fosfataza (ACP) = $\Delta A_1/\text{min} \times 743 = (U/l_1)$

Kwaśna fosfataza niestercząca (ACP-NP) = $\Delta A_2/\text{min} \times 743 = (U/l_2)$

Kwaśna fosfataza sterczowa (PAP) (U/l) = $U/l_1 - U/l_2$

WARTOŚCI REFERENCYJNE

Całkowita kwaśna fosfataza (ACP): < 9 U/l (w temp. 37°C)

Kwaśna fosfataza sterczowa (PAP): < 3.5 U/l (w temp. 37°C)

Aktywność ACP jest rzadka u zdrowy mężczyzn i prawie nieobecna u kobiet dlatego wartości oczekiwane są na granicy błędu aparatu lub bardzo blisko granicy wykrywalności układu reakcji. Jakkolwiek zaleca się dla każdego laboratorium ustalenie własnych wartości referencyjnych.

OGRANICZENIA PROCEDURY

- Zobacz znane interakcje w rozdziale MATERIAŁ BADANY.

- Enzymy są czułe na działanie niektórych zanieczyszczeń oraz inhibitorów (metali ciężkich, cyanków, surfaktantów, itp.) dlatego zaleca się zachowanie szczególnej uwagi podczas mycia sprzętu użytego do pobrania materiału i następnie do oznaczania.
- Wpływ jatrogenny: niektóre leki mogą wpływać na wartości aktywności PAP w osoczu, podobnie masaże, cewnikowanie i inne działania na gruczole sterczowym. Stąd warto dowiedzieć się od lekarza prowadzącego lub pacjenta o lekach, terapii i przeprowadzonych procedurach diagnostycznych.
- Diagnoza kliniczna nie powinna zostać oparta na pojedynczym teście, lecz na pełnym obrazie klinicznym i innych badaniach laboratoryjnych.

METODA KONTROLI JAKOŚCI

W trakcie przeprowadzania badania, za każdym razem, należy przeprowadzać analizę jakości na dwóch poziomach (Standatrol S-E 2 niveles) ze znanym poziomem stężenia Całkowitej kwaśnej fosfatazy i kwaśnej fosfatazy sterczowej.

CHARAKTERYSTYKA TESTU

a) Powtarzalność: zastosowano protokół EP15A CLSI. Analizowano dwa poziomy aktywności, w czterech powtórzeniach, w ciągu 5 dni w analizatorze automatycznym. Z otrzymanych danych wyliczono całkowitą precyzję i precyzję w trakcie badania.

Całkowita kwaśna fosfataza

Precyzja w trakcie badania

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

Całkowita precyzja

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

Kwaśna fosfataza niestercząca

Precyzja w trakcie badania

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

Całkowita precyzja

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

b) Linijność: reakcja jest linijna do 74 U/l ($\Delta A/\text{min} = 0.100$ O.D.). Dla wyższych wartości powtórzyć oznaczenie z rozcieńczoną próbką (0,1 ml materiał badany + 0,2 ml roztworu soli fizjologicznej), mnożąc otrzymane wyniki przez 3.

c) Zakres wykrywalności: minimalna wykrywalna aktywności dla Całkowitej kwaśnej fosfatazy wynosi 0,51 U/l i dla kwaśnej fosfatazy sterczowej 0,48 U/l.

WIENER LAB. DOSTARCZA

- 1 x 40 ml Odczynnik A
- 20 x 2 ml Odczynnik B
- 1 x 40 ml Odczynnik C
- 1 x 5 ml Odczynnik D
(Nr kat. 1351402)

- 1 x 40 ml Odczynnik A
- 20 x 2 ml Odczynnik B
- 1 x 40 ml Odczynnik C
- 1 x 5 ml Odczynnik D
(Nr kat. 1009669)


- 1 x 40 ml Odczynnik A
- 20 x 2 ml Odczynnik B
- 1 x 40 ml Odczynnik C
- 1 x 5 ml Odczynnik D
(Nr kat. 1009922)

ŹRÓDŁA

- 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).

Oznaczenia

Następujące symbole są zastosowane na opakowaniach zestawów odczynników diagnostycznych.

 Ten produkt spełnia wymagania Dyrektywy Europejskiej 98/79 EC dla wyrobów medycznych używanych do diagnozy "in vitro"

 Autoryzowany przedstawiciel we Wspólnocie Europejskiej

 Wyrób do diagnostyki "in vitro"

 Zawartość wystarczająca dla <n> badań

 Użyć przed

 Ograniczenie dopuszczalnych temperatur

 Nie zamrażać

 Ryzyko biologiczne

 Objętość po rozpuszczeniu

 Zawartość


 numer serii

 Wytwórca

 Substancja szkodliwa

 Substancja żrąca


 Substancja drażniąca

 Przed użyciem zapoznać się z instrukcją


 Kalibrator

 Próba kontrolna

 Próba kontrolna dodatnia

 Próba kontrolna ujemna

 Numer katalogowy

 Wiener Laboratorios S.A.I.C.
Riobamba 2944
2000 - Rosario - Argentina
<http://www.wiener-lab.com.ar>
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola
Bioquímica
Producto Autorizado A.N.M.A.T.
Cert. N°: 5781/06



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina