

FOSFATASE ÁCIDA

Instruções de Uso

Ref.: 39

MS 10009010033

Finalidade . Sistema para determinação da fosfatase ácida em amostras de sangue por método cinético de tempo fixo e medição de ponto final.

Uso profissional

[Somente para uso diagnóstico in vitro.]

Princípio . A fosfatase ácida do soro atua sobre o substrato de timolfaleína monofosfato. A adição de álcali inibe a ação enzimática e converte a timolfaleína liberada na sua forma azul, que é medida colorimetricamente. O produto final da reação se constitui de uma mistura de cor azul e a cor própria do substrato.

Características do sistema . Na seleção de um substrato para a determinação da fosfatase ácida prostática, a Labtest concentrou suas pesquisas na timolfaleína monofosfato, que possui maior especificidade para a isoenzima prostática do que os substratos fenil fosfato e p-nitro fenil fosfato.

A especificidade da timolfaleína para a isoenzima da fração prostática não é absoluta, por isso, encontra-se pequena atividade em soro de indivíduos sadios do sexo feminino.

Este método fornece valores mais baixos que os obtidos quando se utiliza substrato de p-nitrofenil ou fenilfosfato, que são também hidrolisados por fosfatases de origem hemática e plaquetária.

O procedimento técnico, realizado em 30 minutos, é extremamente simples e tem uma resposta proporcional à atividade enzimática até 200 vezes os valores de referência com somente uma medida colorimétrica.

Apesar do sistema medir a fosfatase ácida total, os resultados quando elevados podem ser considerados como sendo correspondentes à fração prostática, porque a sensibilidade do substrato às outras frações é consideravelmente diminuída e os valores encontrados para a atividade das fosfatases não prostática são tão reduzidos que não têm significado clínico.

Metodologia . Roy modificado.

Reagentes

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

Após reconstituído, contém timolfaleína monofosfato 1,5 mmol/L.

2. [R2] - Reagente de Cor - Armazenar entre 2 - 25 °C.

Contém carbonato de sódio 50 mmol/L e hidróxido de sódio 50 mmol/L.

3. [CAL] - Padrão 3,0 U/L - Armazenar entre 2 - 8 °C.

Bem vedado para evitar evaporação. Contém timolfaleína 0,09 mmol/L.

4. [R4] - Tampão - Armazenar entre 2 - 25 °C.

Contém tampão 100 mmol/L, pH 5,95 e azida sódica 7,7 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 à contaminações de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

Precauções e cuidados especiais

Os cuidados habituais de segurança devem ser aplicados na manipulação de reagentes.

O Tampão contém 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 em tubulações de chumbo e cobre. Utilizar grandes volumes de água para descartar o reagente.

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 à contaminações de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

Como ocorre com toda reação enzimática, a rigorosa observação do tempo e da temperatura de incubação é de grande importância para a qualidade dos resultados obtidos. A diferença de 1 minuto no tempo de incubação introduz um erro de 3,3% nos resultados.

Material necessário e não fornecido

1. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 °C).

2. Fotômetro capaz de medir, com exatidão, absorvância entre 570 e 610 nm.

3. Pipetas para medir amostras e reagentes.

4. Cronômetro.

Amostra

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

Usar soro ou plasma (heparina).

A atividade enzimática é sensível ao efeito da temperatura e do pH. Portanto, separar o soro ou plasma até 30 minutos após a coleta e acidificar com 0,01 mL de ácido acético 20% (v/v) para cada 1,0 mL da amostra. A atividade enzimática da amostra acidificada é estável 2 dias entre 2 - 8 °C e 1 semana a 10 °C negativos.

Como nenhum teste conhecido pode assegurar que amostras de sangue não transmitem infecções, todas elas devem ser consideradas como potencialmente infectantes. Portanto, na manuseá-las, devem-se seguir 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

Valores de bilirrubina até 5 mg/dL, hemoglobina até 180 mg/dL e triglicérides até 750 mg/dL não produzem interferências significativas.

Valores de bilirrubina acima de 5 mg/dL e triglicérides acima de 750 mg/dL produzem resultados falsamente elevados.

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

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

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

Procedimento

Ver Observações 1, 2 e 3.

Preparo do reagente . Reconstituição do Substrato: transferir o conteúdo do Tampão (20 mL) para o frasco de Substrato e misturar por inversão até dissolução completa. Estável 6 meses entre 2 - 8 °C.

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Controle	Teste	Padrão
Substrato (nº 1)	0,5 mL	0,5 mL	----
Água destilada ou deionizada	----	----	0,5 mL
Padrão (nº 3)	----	----	0,1 mL

Incubar em banho-maria a 37 °C durante 2 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio.

Amostra	----	0,1 mL	----
---------	------	--------	------

Misturar e incubar em banho-maria a 37 °C exatamente por 30 minutos (cronometrados).

Reagente de Cor (nº 2)	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL
Amostra	0,1 mL	----	----

Misturar e determinar as absorbâncias do controle, teste e padrão em 590 nm ou filtro laranja (570 a 610), acertando o zero com água destilada. A cor é estável 120 minutos.

O procedimento sugerido para a medição é adequado para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 2,5 mL. Deve ser feita uma verificação da necessidade de ajuste do volume para o fotômetro utilizado. Os volumes de amostra e reagentes podem ser modificados, proporcionalmente, sem prejuízo para o desempenho do teste e o procedimento de cálculo 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

$$\text{Fosfatase Ácida (U/L)} = \frac{\text{Abs. do Teste} - \text{Abs. do Controle}}{\text{Absorbância do Padrão}} \times 3$$

Exemplo

$$\text{Absorbância do Controle} = 0,018$$

$$\text{Absorbância do Teste} = 0,120$$

$$\text{Absorbância do Padrão} = 0,123$$

$$\text{Fosfatase Ácida (U/L)} = \frac{0,120 - 0,018}{0,123} \times 3 = 2,5$$

Devido a grande reprodutibilidade que pode ser obtida com a metodologia o método do fator pode ser empregado.

$$\text{Fator de calibração} = \frac{3}{\text{Absorbância do Padrão}}$$

$$\text{Fosfatase Ácida (U/L)} = (\text{Abs. do Teste} - \text{Abs. do Controle}) \times \text{Fator}$$

Exemplo

$$\text{Fator de calibração} = \frac{3}{0,123} = 24,39$$

$$\text{Fosfatase Ácida (U/L)} = (0,120 - 0,018) \times 24,39 = 2,5$$

Linearidade

O resultado da medição é linear com cinética de ordem zero até 20 U/L. Quando a absorbância do teste for maior que 1,0, diluir o teste e o controle com o Reagente de Cor, fazer nova leitura e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição. Se após a diluição for obtido um valor igual ou maior que 20 U/L, repetir a medição reduzindo o tempo de incubação após adição da amostra para 10 minutos. Multiplicar o resultado obtido por 3. Sugerimos a verificação da linearidade metodológica e fotométrica no mínimo semestralmente utilizando amostras com valores até 20 U/L.

Controle interno da qualidade . O laboratório deve manter um programa de controle interno da qualidade que defina claramente os regulamentos aplicáveis, objetivos, procedimentos, critérios para especificações 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 nos componentes da variação biológica (VB)^{5,6,7}.

Intervalo de referência . Estes valores devem ser usados apenas como orientação. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça sua própria faixa de valores de referência na população atendida.

0,15 a 0,56 U/L.

Definição de Unidade: uma unidade é igual a quantidade de enzima que libera, por hidrólise, 1 micromol de timolfaleína por minuto, por litro de soro, nas condições do teste.

Características do desempenho⁸

Exatidão . Em duas amostras com valores de fosfatase ácida iguais a 0,6 e 1,5 U/L foram adicionadas quantidades diferentes da enzima obtendo-se recuperações entre 96 e 106%. O erro sistemático proporcional médio obtido em um valor de 0,5 U/L foi igual a 0,005 U/L ou 1,0%.

Especificidade . O método proposto foi comparado com um método utilizando substrato p-nitrofenilfosfato em 80 amostras com valores situados entre 0,14 e 11,0 U/L. A comparação resultou na equação da regressão: $y = 0,044 + 0,339x$ e um coeficiente de correlação (r) igual a 0,99. É evidente uma correlação positiva entre os dois métodos, observando-se uma diferença sistemática de 56% quando se usa um nível de decisão igual a 0,5 U/L que é explicada pela diferença entre os substratos utilizados e as metodologias.

Repetitividade - imprecisão intra-ensaio

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	20	0,64	0,02	3,4
Amostra 2	20	1,52	0,02	1,1
Amostra 3	20	2,71	0,02	0,6

Reprodutibilidade - imprecisão total

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	20	0,58	0,04	7,4
Amostra 2	20	1,46	0,05	3,2
Amostra 3	20	2,69	0,03	1,1

Sensibilidade metodológica . Utilizando-se a absorbância do padrão como parâmetro, verificou-se que o limite de detecção fotométrica é de 0,02 U/L, correspondendo a uma absorbância igual a 0,001.

Efeitos da diluição da matriz . Duas amostras com valores iguais a 85 e 113 U/L foram utilizadas para avaliar a resposta do sistema na avaliação da diminuição do tempo de incubação. Usando tempos de incubação que variaram de 10 a 20 minutos foram encontradas recuperações entre 96 e 112%.

Significado clínico . Níveis séricos elevados da fosfatase ácida prostática são encontrados em pacientes portadores de câncer da próstata.

Dados da literatura demonstram que cerca de 5 a 10% dos pacientes com câncer da próstata no estágio B apresentam níveis séricos elevados da fração prostática. Esta percentagem cresce para 20 a 25% no estágio C, para alcançar 75 a 90% no estágio D.

Pacientes portadores de hipertrofia benigna da próstata (2 a 10%) ou com infarto prostático podem ter níveis séricos ligeiramente elevados da isoenzima prostática.

Elevações têm sido registradas até 48 horas após massagem da próstata e em pacientes que sofrem de obstrução intestinal devido a massagem da próstata realizada pelo bolo fecal.

Indivíduos com metástases ósseas extensas de câncer não prostático, com doenças de Gaucher, Paget, hepática e com plaquetocitose podem apresentar valores elevados de fosfatase ácida quando se utiliza substrato de timolfaleína.

A dosagem da fosfatase ácida prostática é muito útil para avaliar a resposta à estrogoterapia.

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 ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes, usar nas medições e para uso no enxágue final da vidraria, deve ter resistividade ≥ 1 megaohm.cm ou condutividade ≤ 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.






3. Como ocorre com toda reação enzimática, a rigorosa observação do tempo e da temperatura de incubação é de grande importância para a qualidade dos resultados obtidos. A diferença de 1 minuto no tempo de incubação introduz um erro de 3,3% nos resultados.

4. Para uma revisão das fontes medicamentosas de interferência nos resultados e na metodologia, sugere-se consultar: Young, DS. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. 3 ed. Washington: AACC Press, 1990.

Referências

1. Coleman CM, Strojce RC.: Clin Chim Acta 1966:13:401.
2. Bergmeyer HU. Methods of Enzymatic Analysis, 3 ed. vol 4, Deerfield Beach: Verlag Chemie, 1984:92-100.
3. Roy AV, Brower ME, Hayden JE. Clin Chem 1971: 17:1093.
4. Tonks DB. Quality Control in Clinical Laboratories, Warner-Chilcott Laboratories, Diagnostic Reagents Division, Scarborough, Canada, 1972.
5. Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Growth T. Clin Chem 1981;27:493-501.
6. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Base de Datos de Variación Biológica. Disponível em: <<http://www.seqc.es/article/articleview/330/1/170>> (acesso em 04/2006).
7. Basques JC. Especificações da Qualidade Analítica. Labtest Diagnóstica 2005.
8. Labtest: Dados de Arquivo.

Apresentação

Produto	Referência	Conteúdo	
Fosfatase Ácida	39-20	 R 1	1 X 30 µmL  LYOPH
		 R 2	1 X 100 mL
		 CAL	1 X 3 mL
		 R 4	1 X 20 mL

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 33400-000
 Lagoa Santa - Minas Gerais Brasil - www.labtest.com.br


























Serviço de Apoio ao Cliente | 0800 031 34 11 (Ligação Gratuita)
 e-mail: sac@labtest.com.br

Revisão: Maio, 2009
 Ref.: 100517

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

	Conteúdo suficiente para < n > testes Contenido suficiente para < n > tests Contains sufficient for < n > tests		Consultar instruções de uso Consultar instrucciones de uso Consult instructions for use		Controle Control Control		Tóxico Tóxico Poison
	Data limite de utilização (aaaa-mm-dd ou mm/aaaa) Estable hasta (aaaa-mm-dd o mm/aaaa) Use by (yyyy-mm-dd or mm/yyyy)		Número do catálogo Número de catálogo Catalog Number		Controle negativo Control negativo Negative control		Reagente Reactivo Reagent
	Material Calibrador Material Calibrador Calibrator Material		Adições ou alterações significativas Cambios o suplementos significativos Significant additions or changes		Controle positivo Control positivo Positive control		Fabricado por Elaborado por Manufactured by
	Material Calibrador Material Calibrador Calibrator Material		Produto diagnóstico in vitro Dispositivo de diagnóstico in vitro In vitro diagnostic device		Controle Control Control		Número de lote Denominación de lote Batch code
	Limite de temperatura (conservar a) Temperatura limite (conservar a) Temperature limitation (store at)		Liofilizado Liofilizado Lyophilized		Risco biológico Riesgo biológico Biological risk		Período após abertura Período post-abertura Period after-opening
	Representante Autorizado na Comunidade Europeia Representante autorizado en la Comunidad Europea Authorized Representative in the European Community		Corrosivo Corrosivo Corrosive		Marca CE Marcado CE CE Mark		Uso veterinário Uso veterinário Veterinary use
	Instalar até Instalar hasta Install before						

Ref.: 140214 |