

## Utilização prevista

Para a determinação quantitativa de fosfatase ácida no soro. **Rx Only**

## Relevância clínica

Em casos de cancro prostático metastizado, são encontradas grandes elevações de fosfatase ácida prostática. Uma vez que a fosfatase ácida também é produzida noutros tecidos, a isoenzima prostática deve ser diferenciada da não prostática para um diagnóstico preciso. Foram observados níveis elevados de fosfatase ácida não prostática em pacientes com doença de Paget, hiperparatiroidismo com envolvimento esquelético e em cancros que invadiram os ossos.<sup>7</sup>

## História dos métodos

Os compostos de fosfato propostos ao longo dos anos como substratos para medir a atividade da fosfatase ácida incluíam o fenilfosfato,  $\alpha$ -glicerolfosfato,  $\rho$ -nitrofenilfosfato e fosfato de timolftaleína. A maioria dos substratos acima referidos eram insensíveis aos pequenos aumentos na atividade da fosfatase ácida prostática ou eram muito sensíveis à fosfatase ácida não prostática no soro. Roy et al<sup>1</sup> propuseram um método que utilizava monofosfato de timolftaleína de sódio como substrato específico para fosfatase ácida prostática em 1971. Uma modificação realizada por Ewen e Spitzer<sup>2</sup> em 1976 melhorou a sensibilidade do método de Roy. Embora o procedimento modificado tenha encontrado ampla aceitação, tem a desvantagem de ser um procedimento longo e entediante, além de não ser totalmente específico para a fosfatase ácida prostática; medindo também a fosfatase ácida de eritrócitos e plaquetas.

Em 1959, Babson et al<sup>3</sup> propuseram o alfa-naftil fosfato como substrato específico para a fosfatase ácida prostática. A especificidade foi contestada por Amador<sup>4</sup> em 1969.

Hilman<sup>5</sup> propôs um método em 1971 que incluía 2-amino-5-clorotolueno diazotado (Fast Red TR) que formava um corante diazo que era fortemente absorvido a 405 nm. O L-tartarato foi utilizado como um inibidor específico da fosfatase ácida prostática para estabelecer diferencialmente a quantidade de isoenzima prostática.<sup>6</sup> O método cinético acima referido é específico, rápido, simples e pode ser facilmente adaptado aos instrumentos automatizados.

## Princípio

$\alpha$ -naftil fosfato + H<sub>2</sub>O  $\xrightarrow{\text{Fos. ácido}}$   $\alpha$ -naftol + I. Fos.

$\alpha$ -naftol + Fast Red TR  $\xrightarrow{\hspace{10em}}$  corante diazo (Cromóforo)

O  $\alpha$ -naftil fosfato é hidrolisado pela fosfatase ácida sérica em  $\alpha$ -naftol e fosfato inorgânico. A taxa de hidrólise é proporcional à atividade da enzima presente. O  $\alpha$ -naftol produzido é ligado ao Fast Red TR produzindo um complexo colorido que absorve a luz a 405 nm. A reação pode ser quantificada fotometricamente, porque a reação de acoplamento é instantânea. O L-tartarato inibe a fosfatase ácida prostática, mas não interfere no mecanismo de reação. Portanto, se o teste for realizado na presença e na ausência de L-tartarato, a diferença entre os resultados dos dois ensaios é o nível de fosfatase ácida prostática no soro.

## Reagentes

1. Reagente de fosfatase ácida (as concentrações referem-se ao reagente recon.):  $\alpha$ -naftil fosfato 3 mM, Fast Red TR 1 mM, ácido cítrico 20 mM, citrato de sódio 60 mM, pH 5,3  $\pm$  0,1.
2. Reagente de L-tartarato (as concentrações referem-se ao reagente recon.): L-tartarato de sódio 2M, ácido cítrico 70 mM, citrato de sódio 10 mM, pH 5,3  $\pm$  0,1.
3. Tampão de acetato: 5M, pH 5,0.

## Preparação dos reagentes

1. Reconstitua o reagente de fosfatase ácida com o volume de água destilada indicado no rótulo. Faça movimentos circulares para dissolver.
2. Reconstitua o reagente de L-tartarato com 5,0 mL de água destilada. Se necessário, aqueça o reagente para facilitar a dissolução.

3. O tampão de acetato está pronto a utilizar.

## Armazenamento dos reagentes

1. Os frascos por abrir mantêm-se estáveis até à data de validade indicada no rótulo do frasco quando armazenados refrigerados (2-8°C).
2. O reagente de fosfatase ácida reconstituído mantêm-se estável durante 24 horas à temperatura ambiente (22-28°C) e durante 14 dias quando armazenado refrigerado (2-8°C).
3. O reagente de L-tartarato reconstituído mantêm-se estável quando refrigerado (2-8°C) até à data de validade indicada no rótulo do frasco. Caso ocorra cristalização, aqueça a temperaturas moderadas (40-50°C) até à dissolução.
4. A solução tampão de acetato mantêm-se estável quando refrigerada (2-8°C) até à data de validade indicada no rótulo do frasco.

## Deterioração dos reagentes

O reagente não deve ser utilizado se:

1. O reagente de fosfatase ácida reconstituído, sem adição de soro, tem uma absorvância superior a 0,300 quando medida a 405 nm em relação à água.
2. O reagente de L-tartarato é precipitado. Aplique calor (40-50°C) para dissolver novamente o reagente.

## Precauções

Este reagente destina-se apenas a diagnóstico *in vitro*.

## Colheita e armazenamento de amostras

1. Utilize apenas soro transparente e não hemolisado.
2. O soro deve ser separado do coágulo até duas horas após a colheita.
3. A atividade da fosfatase ácida é extremamente instável à temperatura ambiente. Só é possível conseguir a estabilização da enzima acidificando com o tampão de acetato fornecido. **Adicione 20 uL (0,02 mL) de tampão por 1,0 mL de soro. Misture.** As amostras de soro tratado mantêm-se estáveis durante 7 dias quando mantidas refrigeradas a 2-8°C.<sup>8</sup>
4. Não utilize plasma. Alguns anticoagulantes inibem a atividade da fosfatase ácida e/ou provocam turvação.<sup>9</sup>

## Interferências

1. Alegadamente, os níveis elevados de bilirrubina (amostras ictericas) inibem a atividade da fosfatase ácida determinada por este procedimento.<sup>10</sup>
2. Diversos medicamentos e substâncias afetam a atividade da fosfatase ácida. Young, et al<sup>11</sup> publicaram uma lista exaustiva.

## Materiais fornecidos

1. Reagente de fosfatase ácida.
2. Reagente de L-tartarato.
3. Tampão de acetato.

## Materiais necessários, mas não fornecidos

1. Dispositivos de pipetagem precisos
2. Tubos de ensaio/suporte
3. Temporizador
4. Espectrofotómetro com capacidade de leitura a 405 nm.
5. Água destilada/desionizada.
6. A temperatura deve ser rigorosamente controlada durante o ensaio. Deve ser utilizada uma cuvete com temperatura controlada (30 ou 37°C).

## Procedimento (automatizado)

Consulte as instruções de aplicação específicas do instrumento.

## Procedimento (manual)

Nota: Estabilize a fosfatase ácida imediatamente após a separação do soro do coágulo adicionando 20 uL (0,02 mL) de tampão de acetato por 1,0 mL de soro. Misture e guarde no frigorífico até que o ensaio esteja pronto a ser realizado.

# Conjunto de Reagentes de Fosfatase Ácida Pointe

## A. Fosfatase ácida total

1. Reconstitua o reagente de acordo com as instruções.
2. Coloque rótulos nos tubos, "Controlo", "Paciente", etc.
3. Coloque 1,0 mL de reagente em todos os tubos com uma pipeta.
4. Reponha o espectrofotómetro a zero com água a 405 nm. Defina a temperatura da cuvete a 30 ou 37°C.
5. Adicione 100 uL (0,100 mL) de amostra ao respetivo tubo e deixe incubar durante cinco minutos.
6. Após a incubação, leia e registre a absorvância a cada minuto durante cinco minutos para determinar a  $\Delta A/\text{minuto}$ .
7. Repita o procedimento para cada amostra.
8. Os valores (u/L) são obtidos multiplicando a  $\Delta A/\text{minuto}$  pelo fator. Consulte "Cálculo".

## B. Fosfatase ácida não prostática

1. Adicione 1,0 mL de reagente a um tubo devidamente rotulado.
2. Adicione 10 uL (0,010 mL) de reagente de L-tartarato e misture.
3. Reponha o espectrofotómetro a zero com água a 405 nm. Defina a temperatura da cuvete a 30 ou 37°C.
4. Adicione 100 uL (0,100 mL) de amostra, misture e incube durante cinco minutos.
5. Após a incubação, leia e registre a absorvância a cada minuto durante cinco minutos para determinar a  $\Delta A/\text{minuto}$ .
6. Os valores (u/L) são obtidos multiplicando a  $\Delta A/\text{minuto}$  pelo fator. Consulte "Cálculo".

## C. Fosfatase ácida prostática

1. O valor é obtido subtraindo o resultado do ensaio de fosfatase ácida não prostática (B) do ensaio de fosfatase ácida total (A).

## Limitações

As amostras com valores superiores a 35 u/L a 30°C, ou superiores a 40 u/L a 37°C, devem ser diluídas a 1:9 com solução salina, novamente submetidas a ensaio e o resultado final deve ser multiplicado por 10.

## Cálculo

Uma unidade internacional é definida como a quantidade de enzima que catalisa a transformação de um micromole de substrato por minuto em condições definidas.

### A. Cálculo da fosfatase ácida total.

$$\frac{\Delta A/\text{Min} \times 10^6 \times 1,1}{12,9 \times 10^3 \times 1,0 \times 0,1} = u/L = \Delta A/\text{Min} \times 853$$

### B. Cálculo da fosfatase ácida não prostática.

$$\frac{\Delta A/\text{Min} \times 10^6 \times 1,11}{12,9 \times 10^3 \times 1,0 \times 0,1} = u/L = \Delta A/\text{Min} \times 860$$

Em que:

- 10<sup>6</sup> = Conversão de moles para milimoles
- 1,1 = Volume de reação total (F.A. total)
- 1,11 = Volume de reação total (F.A. não prost.)
- 12,9x10<sup>3</sup> = Capacidade de absorção molar do complexo  $\alpha$ -naftol Fast Red TR a 405 nm.
- 1,0 = Trajetória da luz em cm.
- 0,1 = Volume de amostra (mL).

Cálculos das amostras:

$\Delta A/\text{Min}$ . de fosfatase ácida total = 0,010

$\Delta A/\text{Min}$ . Fosfatase ácida não prostática = 0,009

Fosfatase ácida total: 0,010 x 853 = 8,5 u/L

Fosfatase ácida não prostática: 0,009 x 860 = 7,7 u/L

Fosfatase ácida prostática: 8,5 - 7,7 = 0,8 u/L

## Controlo da qualidade

1. A integridade da reação deve ser monitorizada através da utilização de um soro de controlo normal e anormal com valores conhecidos de fosfatase ácida.
2. A fosfatase ácida nos soros de controlo é mais instável do que nos soros frescos. Adicione 20 uL (0,02 mL) de tampão de acetato por 1,0 mL de água utilizada para reconstituir os soros de controlo.

Fosfatase ácida prostática: 0-3 u/L a 30°C, 0,2-3,5 u/L a 37°C

Os valores foram retirados da literatura.<sup>12</sup> Recomenda-se vivamente que cada laboratório estabeleça o seu próprio intervalo de valores normais.

## Desempenho

1. Linearidade: 35 u/L a 30°C, 40 u/L a 37°C
2. Comparação: Um estudo realizado utilizando este método com um reagente comercial com uma formulação semelhante produziu os seguintes resultados:

|                            | Total        | Prostática   |
|----------------------------|--------------|--------------|
| N= 26                      |              |              |
| Coefficiente de correlação | 0,998        | 0,994        |
| Equação de regressão       | y=0,97x-0,40 | y=0,97x-0,25 |

## 3. Precisão:

| Na mesma determinação (N=15) |      |                  | Entre determinações (N=15) |      |        |
|------------------------------|------|------------------|----------------------------|------|--------|
| Média                        | D.P. | % C.V.           | Média                      | D.P. | % C.V. |
| 8,7                          | 0,14 | 1,6 (Total)      | 3,7                        | 0,28 | 7,6    |
| 33,3                         | 0,29 | 0,9 (Total)      | 7,8                        | 0,18 | 2,3    |
| 7,2                          | 0,57 | 7,9 (Prostática) | 32,7                       | 0,36 | 1,1    |
| 29,4                         | 0,67 | 2,3 (Prostática) |                            |      |        |

## Bibliografia

1. Roy, A.V., et al, Clin. Chem. 17:1093 (1971).
2. Ewen, L.M., Spitzer, R.W., Clin. Chem. 22:627 (1976).
3. Babson, A.L., et al, Am. J. Clin. Path. 32:83 (1959).
4. Amador, E., et al, Am. J. Clin. Path. 51:202 (1969).
5. Hillman, G.Z., Klin. Chem. Klin. Biochem. 3:273 (1971).
6. Fabiny-Byrd, D.L., Ertingshausen, G., Clin. Chem. 13:841 (1972).
7. Tietz, N.W., Fundamentals of Clinical Chemistry, Philadelphia, W.B. Saunders, p.614 (1976).
8. Ellis, G., et al, J. Clin. Path. 24:493 (1971).
9. Henry, R.J., Clin. Chem. Prin. And Tech., Hoeber, NY (1964).
10. Shaw, L.M., et al, Am. J. Clin. Path. 68:57 (1977).
11. Young, D.S., et al, Clin. Chem. 21:No.5 (1975).
12. Tietz, N.W., Fund. Of Clin. Chem. Philadelphia, W.B. Saunders, p.618 (1976).

## Legenda dos símbolos

|   |   |
|---|---|
| Utilizar até (AAAA-MM-DD)                         | Lote e código   |
| Número de catálogo                                | Fabricante  |
| Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i> | Limite de temperatura                                     |
| Consulte as instruções de utilização              | <b>Rx Only:</b> Utilização apenas mediante receita médica |
| Marcação CE                                       | Representante autorizado na Comunidade Europeia           |

A7503 Fabricado por HORIBA Instruments Incorporated-Pointe Brand 5449 Research Drive Canton, MI 48188 2°C

Fabricado por HORIBA Instruments Incorporated – Pointe Brand  
5449 Research Drive, Canton, MI 48188

Representante Europeu Autorizado:

Obelis s.a.

Boulevard Général Wahis 53

1030 Brussels, BÉLGICA

Tel.: (32)2.732.59.54 Fax: (32)2.732.60.03 e-mail: mail@obelis.net

## Certificada para executar reagentes

Os reagentes Pointe são certificados para serem fabricados de acordo com parâmetros especificados. Qualquer produto de reagente Pointe que não cumpra as especificações até à data de validade indicada será regularizado imediatamente sem quaisquer custos.

## Valores esperados

Fosfatase ácida total: 0-9 u/L a 30°C, 2,5-11,7 u/L a 37°C