

Przeznaczenie

Do ilościowego oznaczania kwaśnej fosfatazy w surowicy. Tylko Rx

Znaczenie kliniczne

Duże podwyższenie kwaśnej fosfatazy gruczołu krokowego stwierdza się w przypadkach raka gruczołu krokowego z przerzutami. Ponieważ kwaśna fosfataza jest również wytwarzana w innych tkankach, w celu dokładnego rozpoznania należy odróżnić izoenzym gruczołu krokowego od nieprostatacznego. Podwyższone poziomy kwaśnej fosfatazy nieprostatacznej obserwowano u pacjentów z chorobą Pageta, nadczynnością przytarczyc z zajęciem układu kostnego oraz nowotworami, które nacięły kości.⁷

Metodyka

Związki fosforanowe proponowane przez lata jako substraty do pomiaru aktywności kwaśnej fosfatazy obejmowały fenylofosforan, D- glicerolfosforan, D- nitrofenylofosforan i fosforan tymoloftaleiny. Większość z powyższych substratów była albo niewrażliwa na niewielki wzrost aktywności kwaśnej fosfatazy gruczołu krokowego, albo była zbyt wrażliwa na kwaśną fosfatazę nieprostataczną w surowicy. W 1971 roku Roy i wsp.¹ zaproponowali metodę wykorzystującą monofosforan tymoloftaleiny sodu jako specyficzny substrat dla kwaśnej fosfatazy prostaty. Modyfikacja dokonana przez Ewena i Spitzera² w 1976 roku poprawiła czułość metody Roya. Chociaż zmodyfikowana procedura znalazła szeroką akceptację, jej wady wynikają z tego, że jest to procedura długa i żmudna, a także nie jest całkowicie specyficzna dla kwaśnej fosfatazy prostaty; również pomiar erytrocytów i kwaśnej fosfatazy płytkowej.

W 1959 roku Babson i wsp.³ zaproponowali alfa-naftylofosforan jako specyficzny substrat dla kwaśnej fosfatazy gruczołu krokowego. Specyfika została zakwestionowana przez Amador⁴ w 1969 roku.

Hilman⁵ w 1971 roku zaproponował metodę, która obejmowała diazowany 2-amino-5-chlorotoluen (Fast Red TR), tworzący barwnik diazowy, który silnie absorbował przy 405 nm. L-winian zastosowano jako specyficzny inhibitor kwaśnej fosfatazy gruczołu krokowego w celu ustalenia zróżnicowanej ilości izoenzymu gruczołu krokowego.⁶ Powyższa metoda kinetyczna jest specyficzna, szybka, prosta i może być łatwo dostosowana do zautomatyzowanego oprzyrządowania.

Zasada działania

Kwas Fosf..

α -fosforan naftyli + H₂O -----> α naftol + fosforan nieorganiczny

α -naftol + Fast Red TR -----> Barwnik diazowy (Chromofor)

α -fosforan naftyli jest hydrolizowany przez kwaśną fosfatazę surowicy do α -naftolu oraz nieorganicznego fosforanu. Szybkość hydrolizy jest proporcjonalna do aktywności enzymu. Wytworzony α -naftol jest sprzężony z Fast Red TR w celu wytworzenia barwnego kompleksu, który absorbuje światło o długości fali 405 nm. Reakcję można ocenić ilościowo fotometrycznie, ponieważ reakcja sprzężania jest natychmiastowa. L-winian hamuje kwaśną fosfatazę prostaty, ale nie zakłóca mechanizmu reakcji. Dlatego też, jeśli badanie przeprowadza się w obecności i pod nieobecność L-winianu, różnica między wynikami obu testów polega na poziomie kwaśnej fosfatazy gruczołu krokowego w surowicy.

Odczynniki

- Odczynnik kwaśnej fosfatazy (stężenia odnoszą się do rekon. odczynnika): D- fosforan naftyli 3 mM, Fast Red TR 1mM, kwas cytrynowy 20mM, cytrynian sodu 60mM, pH 5.3 ± 0.1.
- Odczynnik L-winian (stężenia odnoszą się do rekon. odczynnika): L-winian sodu 2M, kwas cytrynowy 70 mM, cytrynian sodu 10 mM, pH 5.3 ± 0.1.
- Bufor octanowy: 5M, pH 5.0.

Przygotowanie odczynnika

- Rozpuść odczynnik kwaśnej fosfatazy w objętości wody destylowanej podanej na etykiecie. Wirować do rozpuszczenia. Rozpuścić odczynnik L-winianowy w

5,0 ml wody destylowanej. Ogrzać odczynnik, aby wspomóc rozpuszczanie, jeśli to konieczne.

- Bufor octanowy jest gotowy do użycia.

Przechowywanie odczynników

- Nieotwarte fiołki są stabilne do daty ważności podanej na etykiecie fiołki, jeśli są przechowywane w lodówce (2-8°C).
- Rozpuszczony odczynnik kwaśnej fosfatazy jest stabilny przez 24 godziny w temperaturze pokojowej (22-28°C) i przez 14 dni, jeśli jest przechowywany w lodówce (2-8°C).
- Rozpuszczony odczynnik L-winianu jest stabilny w lodówce (2-8°C) do daty ważności podanej na etykiecie fiołki. Jeśli wystąpi krystalizacja, ogrzewać w umiarkowanych temperaturach (40-50°C) aż do rozpuszczenia.
- Roztwór buforu octanowego jest stabilny w lodówce (2-8°C) do daty ważności podanej na etykiecie fiołki.

Pogorszenie jakości odczynnika

Odczynnika nie należy używać, jeśli:

- Rekonstruowany odczynnik kwaśnej fosfatazy, bez dodatku surowicy, ma absorbancję większą niż 0,300, mierzoną przy długości fali 405 nm względem wody.
- Wytrąca się odczynnik L-winianu. Zastosuj temperaturę (40-50°C), aby ponownie rozpuścić odczynnik.

Środki ostrożności

Odczynnik przeznaczony wyłącznie do diagnostyki *in vitro*.

Pobieranie i przechowywanie próbek

- Stosować wyłącznie czystą, niezahemolizowaną surowicę.
- Surowicę należy oddzielić od skrzepu w ciągu dwóch godzin po pobraniu.
- Aktywność kwaśnej fosfatazy jest wyjątkowo nietrwała w temperaturze pokojowej. Stabilizację enzymu można osiągnąć jedynie przez zakwaszenie dostarczonym buforem octanowym. **Dodać 20ul (0.02ml) buforu na 1.0ml surowicy. Mieszać.** Poddane obróbce próbki surowicy pozostaną stabilne przez 7 dni, jeśli będą przechowywane w lodówce w temperaturze 2-8°C.⁸
- Nie używaj plazmy. Niektóre antykoagulanty hamują aktywność kwaśnej fosfatazy i/lub powodują zmętnienie.⁹

Interferencje

- Wysokie poziomy bilirubiny (próbki żółtaczkowe) podobno hamują aktywność kwaśnej fosfatazy określoną tą procedurą.¹⁰
- Szereg leków i substancji wpływa na aktywność fosfatazy kwaśnej. Young i wsp.¹¹ opublikowali obszerną listę.

Materiały dostarczane

- Odczynnik kwaśnej fosfatazy.
- Odczynnik L-winianowy.
- Bufor octanowy.

Materiały wymagane, niewchodzące w skład produktu

- Dokładne urządzenia do pipetowania
- Probówki/stojak
- Stoper
- Spektrofotometr z możliwością odczytu przy długości fali 405 nm.
- Woda destylowana/dejonizowana.
- Temperatura musi być ściśle kontrolowana podczas testu. Należy użyć kuwety z kontrolowaną temperaturą (30 lub 37°C).

Procedura (Automat)

Zgodnie z wytycznymi aplikacji na dany analizator.

Procedura (Manualna)

Uwaga: Ustabilizuj kwaśną fosfatazę natychmiast po oddzieleniu surowicy od skrzepu, dodając 20 ul (0,02 ml) buforu octanowego na 1,0 ml surowicy. Wymieszać i przechowywać w lodówce, aż oznaczenie będzie gotowe do wykonania.

A. Całkowita kwaśna fosfataza

1. Rozpuścić odczynnik zgodnie z instrukcją.
2. Oznaczyć próbki napisem „Kontrola”, „Pacjent” itp.
3. Odpipetować 1,0 ml odczynnika do wszystkich próbek.
4. Spektrofotometr zerowy z wodą przy 405 nm. Ustawić temperaturę kuwety na 30 lub 37°C.
5. Dodać 100 ul (0,100 ml) próbki do odpowiedniej próbki i pozostawić do inkubacji przez pięć minut.
6. Po inkubacji odczytaj i zapisz absorbancję co minutę pięć minut, aby określić $\Delta A/\text{minutę}$.
7. Powtórz procedurę dla każdej próbki.
8. Wartości (u/L) uzyskuje się mnożąc $\Delta A/\text{minutę}$ przez współczynnik. Patrz „Obliczenia”.

B. Nieprostatyczna kwaśna fosfataza

1. Dodać 1,0 ml odczynnika do odpowiednio oznaczonej próbki.
2. Dodać 10 ul (0,010 ml) odczynnika L-winian i wymieszać.
3. Spektrofotometr zerowy z wodą przy 405 nm. Ustawić temperaturę kuwety na 30 lub 37°C.
4. Dodać 100 ul (0,100 ml) próbki, wymieszać i inkubować przez pięć minut.
5. Po inkubacji odczytaj i zapisz absorbancję co minutę przez pięć minut, aby określić $\Delta A/\text{minutę}$.
6. Wartości (u/L) uzyskuje się mnożąc $\Delta A/\text{minutę}$ przez współczynnik. Patrz „Obliczenia”.

C. Kwaśna fosfataza prostaty

1. Wartość uzyskuje się przez odjęcie wyniku testu kwaśnej fosfatazy niezwiązanej z prostatą (B) od wyniku testu całkowitej kwaśnej fosfatazy (A).

Ograniczenia

Próbki o wartościach powyżej 35u/L w temperaturze 30°C lub powyżej 40u/L w temperaturze 37°C należy rozcieńczyć solą fizjologiczną w stosunku 1:9, ponownie przeanalizować, a wynik końcowy pomnożyć przez 10.

Obliczenia

Jedna jednostka międzynarodowa jest zdefiniowana jako ilość enzymu, która katalizuje przemianę jednego mikromola substratu na minutę w określonych warunkach.

A. Obliczenie całkowitej kwaśnej fosfatazy

$$\frac{\Delta A/\text{Min} \times 10^6 \times 1.1}{12.9 \times 10^3 \times 1.0 \times 0.1} = \text{u/L} = \Delta A/\text{Min} \times 853$$

B. Obliczenie kwaśnej fosfatazy nieprostatycznej

$$\frac{\Delta A/\text{Min} \times 10^6 \times 1.11}{12.9 \times 10^3 \times 1.0 \times 0.1} = \text{u/L} = \Delta A/\text{Min} \times 860$$

Gdzie:

- 10⁶ = Konwersja moli na milimole
- 1.1 = Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej (całkowita AP)
- 1.11 = Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej (Non-Prost. A.P.)
- 12.9x10³ = Molarna absorpcja λ -naftolu Fast Red TR Complex przy 405 nm.
- 1.0 = Ścieżka światła w cm.
- 0.1 = Objętość próbki (ml).

Przykładowe obliczenia:

$\Delta A/\text{Min}$. całkowita kwaśna fosfataza = 0,010

$\Delta A/\text{Min}$. Kwaśna fosfataza nieprostatyczna = 0,009 Całkowita kwaśna fosfataza: 0,010 x 853 = 8,5 u/l

Kwaśna fosfataza nieprostatyczna: 0,009 x 860 = 7,7 u/l

Kwaśna fosfataza prostaty: 8,5 – 7,7 = 0,8 u/l

Kontrola jakości

1. Należy monitorować integralność reakcji, stosując normalną i nieprawidłową surowicę kontrolną o znanych wartościach kwaśnej fosfatazy.
2. Fosfataza kwaśna w surowicach kontrolnych jest mniej trwała niż w surowicach świeżych. Dodać 20 ul (0,02 ml) buforu octanowego na 1,0 ml wody użytej do rozpuszczenia surowic kontrolnych.

Wartości oczekiwane

Kwaśna fosfataza całkowita: 0-9u/L at 30°C, 2.5-11.7u/L at 37°C Kwaśna fosfataza

prostaty: 0-3u/L at 30°C, 0.2-3.5u/L at 37°C

Wartości zostały zaczerpnięte z literatury.¹² Zdecydowanie zaleca się, aby każde laboratorium ustaliło swój własny zakres normy.

Wydajność

1. Liniowość: 35 u/L at 30°C, 40u/L at 37°C
2. Porównanie: Badanie przeprowadzone tą metodą z komercyjnym odczynnikiem o podobnym składzie dało następujące wyniki:
N= 26

	Całkowita	Prostaty
Współczynnik korelacji	0.998	0.994
Równanie regresji	y=0.97x-0.40	y=0.97x-0.25
3. Precyzja:

W serii (N=15)			Całkowita (N=15)		
Średnia	S.D.	C.V.%	Średnia	S.D.	C.V.%
8.7	0.14	1.6 (Całkowita)	3.7	0.28	7.6
33.3	0.29	0.9 (Całkowita)	7.8	0.18	2.3
7.2	0.57	7.9 (Prostaty)	32.7	0.36	1.1
29.4	0.67	2.3 (Prostaty)			

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).

Symbole

Termin przydatności (RRRR-MM-DD) (LOT Numer LOT oraz kod kreskowy
REF Numer katalogowy	Producent
IVD Wyłącznie do diagnostyki <i>in vitro</i>	Zakres temperatur
Zapoznaj się z instrukcją użytkownika	Tylko Rx: Wyłącznie do zastosowania profesjonalnego
CE Znak CE	EC REP Autoryzowany przedstawiciel na Europę

REF A7503	Wyprodukowano przez HORIBA Instruments Incorporated-Pointe Brand 5449 Research Drive Canton, MI 48188	2°C - 8°C	IVD
------------------	---	-----------	------------

Manufactured by HORIBA Instruments Incorporated – Pointe Brand
5449 Research Drive, Canton, MI 48188

European Authorized Representative:
Obelis s.a.
Boulevard Général Wahis 53
1030 Brussels, BELGIUM

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

Certyfikacja

Odczynniki Pointe są certyfikowane zgodnie z określonymi parametrami. Każdy odczynnik Pointe, który nie spełnia specyfikacji w podanym terminie ważności, zostanie natychmiast i bezpłatnie wymieniony.