

Utilisation

Pour la détermination quantitative de la phosphatase acide dans le sérum. **Usage médical uniquement.**

Signification clinique

Des élévations importantes de la phosphatase acide prostatique sont observées dans les cas de cancer prostatique métastasé. La phosphatase acide étant également produite dans d'autres tissus, l'isoenzyme prostatique doit être distinguée de l'isoenzyme non prostatique pour permettre un diagnostic précis. Des taux élevés de phosphatase acide non prostatique ont été observés chez des patients atteints de la maladie de Paget, d'hyperparathyroïdie avec atteinte du squelette et de cancers ayant envahi les os.⁷

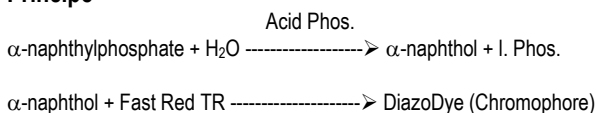
Historique

Les composés phosphatés proposés au fil des ans comme substrats pour mesurer l'activité de la phosphatase acide comprenaient le Phénylphosphate, α -Glycérolphosphate, ρ -Nitrophénylphosphate et le phosphate de thymolphthaléine. La plupart des substrats susmentionnés étaient soit insensibles aux faibles augmentations de l'activité de la phosphatase acide prostatique, soit trop sensibles à la phosphatase acide non prostatique présente dans le sérum. En 1971, Roy et al¹ ont proposé une méthode utilisant la thymolphthaléine monophosphate de sodium comme substrat spécifique de la phosphatase acide prostatique. Une modification apportée par Ewen et Spitzer² en 1976 a permis d'améliorer la sensibilité de la méthode de Roy. Bien que la procédure modifiée ait été largement acceptée, elle souffre d'être longue et fastidieuse et de ne pas être totalement spécifique de la phosphatase acide prostatique ; elle mesure également la phosphatase acide érythrocytaire et plaquettaire.

En 1959, Babson et al³ ont proposé l'alpha-naphthylphosphate comme substrat spécifique de la phosphatase acide prostatique. Cette spécificité a été contestée par Amador⁴ en 1969.

En 1971, Hilman⁵ a proposé une méthode utilisant le 2-amino-5-chlorotoluène diazoté (Fast Red TR), qui forme un colorant diazoïque absorbant fortement à 405 nm. Le L-Tartrate a été utilisé comme inhibiteur spécifique de la phosphatase acide prostatique pour établir de façon différentielle la quantité d'isoenzyme prostatique.⁶ La méthode cinétique ci-dessus est spécifique, rapide, simple et peut être facilement adaptée à une instrumentation automatisée.

Principe



α -naphthylphosphate est hydrolysé par la phosphatase acide sérique en α -naphthol et en phosphate inorganique. La vitesse d'hydrolyse est proportionnelle à l'activité enzymatique présente. Le α -naphthol produit est couplé au Fast Red TR pour produire un complexe coloré qui absorbe la lumière à 405 nm. La réaction peut être quantifiée par photométrie car la réaction de couplage est instantanée. Le L-Tartrate inhibe la phosphatase acide prostatique mais n'interfère pas avec le mécanisme de réaction. Par conséquent, si le test est effectué en présence et en l'absence de L-Tartrate, la différence entre les résultats des deux tests est le niveau de phosphatase acide prostatique dans le sérum.

Réactifs

- Réactif de phosphatase acide (les concentrations se réfèrent au réactif recon.) : α -naphthylphosphate 3mM, Fast Red TR 1mM, acide citrique 20mM, citrate de sodium 60mM, pH 5,3 \pm 0,1.
- Réactif L-Tartrate (les concentrations se réfèrent au réactif recon.) : L-Tartrate de sodium 2M, acide citrique 70mM, citrate de sodium 10mM, pH 5,3 \pm 0,1.
- Tampon d'acétate : 5M, pH 5.0.

Préparation du réactif

- Reconstituer le réactif de la phosphatase acide avec le volume d'eau distillée indiqué sur l'étiquette. Agiter pour dissoudre.
- Reconstituer le réactif L-Tartrate avec 5,0 ml d'eau distillée. Réchauffer le réactif pour faciliter la dissolution, si nécessaire.
- Le tampon acétate est prêt à l'emploi.

Stockage du réactif

- Les flacons non ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du flacon lorsqu'ils sont conservés au réfrigérateur (2-8°C).
- Le réactif de phosphatase acide reconstitué est stable pendant 24 heures à température ambiante (22-28°C) et pendant 14 jours lorsqu'il est conservé au réfrigérateur (2-8°C).
- Le réactif L-Tartrate reconstitué est stable au réfrigérateur (2-8°C), jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du flacon. En cas de cristallisation, réchauffer à température modérée (40-50°C) jusqu'à dissolution.
- La solution tampon d'acétate est stable au réfrigérateur (2-8°C) jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du flacon.

Détérioration du réactif

Le réactif ne doit pas être utilisé si :

- Le réactif de phosphatase acide reconstitué, sans ajout de sérum, présente une absorbance supérieure à 0,300 lorsqu'elle est mesurée à 405 nm contre de l'eau.
- Le réactif L-Tartrate est précipité. Chauffer (40-50°C) pour redissoudre le réactif.

Précautions

Ce réactif est uniquement destiné au diagnostic *in vitro*.

Recueil et stockage des échantillons

- N'utiliser que du sérum clair, non hémolysé.
- Le sérum doit être séparé du caillot dans les deux heures suivant le prélèvement.
- L'activité de la phosphatase acide est extrêmement labile à température ambiante. La stabilisation de l'enzyme ne peut être obtenue qu'en acidifiant avec le tampon acétate fourni. Ajouter 20ul (0.02ml) de tampon pour 1.0ml de sérum. Mélanger. Les échantillons de sérum traités resteront stables pendant 7 jours s'ils sont conservés au réfrigérateur entre 2 et 8°C.⁸
- Ne pas utiliser de plasma. Certains anticoagulants inhibent l'activité de la phosphatase acide et/ou provoquent une turbidité.⁹

Interférences

- Des niveaux élevés de bilirubine (échantillons icteriques) inhiberaient l'activité de la phosphatase acide déterminée par cette procédure.¹⁰
- Un certain nombre de médicaments et de substances affectent l'activité de la phosphatase acide. Young, et al¹¹ a publié une liste complète.

Matériels fournis

- Réactif de phosphatase acide.
- Réactif au L-Tartrate.
- Tampon acétate.

Matériel requis mais non fournis

- Dispositifs de pipetage précis
- Tubes à essai/portoir
- Chronomètre
- Spectrophotomètre capable de lire à 405 nm.
- Eau distillée/désionisée.
- La température doit être étroitement contrôlée pendant l'essai. Une cuvette à température contrôlée (30 ou 37°C) doit être utilisée.

Procédure (automatisée)

Se référer aux instructions spécifiques d'application de l'instrument.

Procédure (manuelle)

Note : stabiliser la phosphatase acide immédiatement après la séparation du sérum du caillot en ajoutant 20ul (0.02ml) de tampon acétate pour 1.0ml de sérum. Mélanger et conserver au réfrigérateur jusqu'à ce que le dosage soit prêt à être effectué.

Pointe Phosphatase acide Kit de réactifs

A. Phosphatase acide totale

1. Reconstituer le réactif conformément aux instructions.
2. Étiqueter les tubes : "Contrôle", "Patient", etc.
3. Pipeter 1,0 ml de réactif dans tous les tubes.
4. Mettre le spectrophotomètre à zéro avec de l'eau à 405nm. Régler la température de la cuvette à 30 ou 37°C.
5. Ajouter 100ul (0,100 ml) d'échantillon dans chaque tube et laisser incuber pendant cinq minutes.
6. Après l'incubation, lire et enregistrer l'absorbance toutes les minutes pendant cinq minutes pour déterminer $\Delta A/\text{minute}$.
7. Répéter la procédure pour chaque échantillon.
8. Les valeurs (u/L) sont obtenues en multipliant le $\Delta A/\text{minute}$ par le facteur. Voir "Calcul".

B. Phosphatase acide non prostatique

1. Ajouter 1,0 ml de réactif dans un tube correctement étiqueté.
2. Ajouter 10ul (0,010 ml) de réactif L-Tartrate et mélanger.
3. Mettre le spectrophotomètre à zéro avec de l'eau à 405nm. Régler la température de la cuvette à 30 ou 37°C.
4. Ajouter 100ul (0.100 ml) d'échantillon, mélanger et incuber pendant cinq minutes.
5. Après l'incubation, lire et enregistrer l'absorbance toutes les minutes pendant cinq minutes pour déterminer $\Delta A/\text{minute}$.
6. Les valeurs (u/L) sont obtenues en multipliant $\Delta A/\text{minute}$ par le facteur. Voir "Calcul".

a. Phosphatase acide prostatique

1. La valeur est obtenue en soustrayant le résultat du dosage de la phosphatase acide non statique (B) du dosage de la phosphatase acide totale (A).

Limites

Les échantillons dont les valeurs sont supérieures à 35u/L à 30°C, ou supérieures à 40u/L à 37°C, doivent être dilués dans une proportion de 1:9 avec une solution saline, refaits et le résultat final doit être multiplié par 10.

Calcul

Une unité internationale est définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une micromole de substrat par minute dans des conditions définies.

A. Calcul de la phosphatase acide totale.

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

B. Calcul de la phosphatase acide non prostatique.

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

Où :

- 10⁶ = Conversion des moles en millimoles
- 1.1 = Volume total de réaction (total A.P.)
- 1.11 = Volume total de réaction (Non-Prost. A.P.)
- 12.9x10³ = Absorption molaire du complexe Fast Red TR α -naphthol à 405nm.
- 1.0 = Chemin lumineux en cm.
- 0.1 = Volume d'échantillon (ml).

Exemples de calculs :

- $\Delta A/\text{Min}$. total acide phosphatase = 0.010
- $\Delta A/\text{Min}$. Phosphatase acide non-prostatique = .009
- Phosphatase acide totale : 0.010 x 853 = 8.5 u/L
- Phosphatase acide non prostatique : .009 x 860 = 7.7 u/L
- Phosphatase acide prostatique : 8.5 - 7.7 = 0.8 u/L

Contrôle qualité

1. L'intégrité de la réaction doit être contrôlée par l'utilisation d'un sérum de contrôle normal et anormal dont les valeurs de phosphatase acide sont connues.

2. La phosphatase acide dans les sérums de contrôle est plus labile que dans les sérums frais. Ajouter 20ul (0.02 ml) de tampon acétate par 1.0ml d'eau utilisée pour reconstituer les sérums de contrôle.

Valeurs attendues

Phosphatase acide totale : 0-9u/L à 30°C, 2.5-11.7u/L à 37°C

Phosphatase acide prostatique : 0-3u/L à 30°C, 0.2-3.5u/L à 37°C

Les valeurs sont tirées de la littérature.¹² Il est fortement recommandé que chaque laboratoire établisse sa propre fourchette normale.

Performance

1. Linéarité : 35 u/L à 30°C, 40u/L à 37°C
2. Comparaison : une étude réalisée à l'aide de cette méthode et d'un réactif commercial de formulation similaire a donné les résultats suivants :

N= 26	Total	Prostatique
Coefficient de corrélation	0,998	0,994
Équation de régression	y=0,97x-0,40	y=0,97x-0,25
3. Précision :

Sur une exécution (N=15)










Moy.	S.D.	C.V.%	Moy.	S.D.	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 (Prostatique)	32.7	0.36	1.1
29.4	0.67	2.3 (Prostatique)			



Run to Run (N=15)

Références

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).

Symbol Key

 Use by (YYYY-MM-DD)	 LOT Lot and batch code
 REF Catalog number	 Manufacturer
 IVD <i>In vitro</i> diagnostic medical device	 Temperature limitation
 Consult instructions for use	Rx Only: Prescription Use Only
 CE mark	 EC REP Authorized representative in the European Community

REF A7503	 Manufactured by 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



Certifié pour fabriquer des réactifs

Les réactifs de Pointe sont certifiés comme étant fabriqués selon des paramètres spécifiés. Tout produit réactif de Pointe ne répondant pas aux spécifications jusqu'à sa date d'expiration indiquée sera immédiatement corrigé sans frais.