

## Utilizarea prevăzută

Pentru determinarea cantitativă a fosfatazei acide în ser. **Rx Only.**

## Semnificația clinică

Niveluri foarte ridicate ale fosfatazei acide prostatice apar în cazurile de cancer de prostată cu metastaze. Întrucât fosfataza acidă este produsă și în alte țesuturi, izoenzima prostatică trebuie diferențiată de cea non-prostatică pentru un diagnostic precis. Au fost observate niveluri crescute de fosfatază acidă non-prostatică la pacienții cu boala Paget, hiperparatiroidism cu afectare a scheletului și în cancerele care au invadat oasele.<sup>7</sup>

## Istoricul metodei

Compușii fosfatați propuși de-a lungul anilor ca substraturi pentru măsurarea activității fosfatazei acide includ fenilfosfat,  $\alpha$ -glicerolfosfat,  $p$ -nitrofenilfosfat și fosfat de timolftaleină. Majoritatea substraturilor de mai sus au fost fie insensibile la micile creșteri ale activității fosfatazei acide prostatice, fie au fost prea sensibile la fosfataza acidă non-prostatică din ser. În 1971, Roy et al<sup>1</sup> au propus o metodă care folosește timolftaleină monofosfat de sodiu ca substrat specific pentru fosfataza acidă prostatică. O modificare efectuată de Ewen and Spitzer<sup>2</sup> în 1976 a îmbunătățit sensibilitatea metodei Roy. Chiar dacă procedura modificată s-a bucurat de o largă acceptare, aceasta are dezavantajul că este o procedură lungă și minuțioasă și că nu este total specifică pentru fosfataza acidă prostatică; de asemenea, măsoară fosfataza acidă eritrocitară și trombocitară.

În 1959, Babson et al<sup>3</sup> au propus o metodă care folosește alfa-naftilfosfat ca substrat specific pentru fosfataza acidă prostatică. Specificitatea a fost contestată de Amador<sup>4</sup> în 1969.

În 1971, Hilman<sup>5</sup> a propus o metodă care includea 2-amino-5-clorotoluen diazotizat (Fast Red TR) care forma un colorant diazoic, puternic absorbant la 405 nm. L-tartratul a fost utilizat ca inhibitor specific al fosfatazei acide prostatice pentru a stabili diferențial cantitatea de izoenzimă prostatică.<sup>6</sup> Metoda cinetică de mai sus este specifică, rapidă, simplă și poate fi ușor adaptată la instrumentele automate.

## Principiul

Fosfatază acidă  
 $\alpha$ -naftilfosfat + H<sub>2</sub>O ----->  $\alpha$ -naftol + I. Fos.

$\alpha$ -naftol + Fast Red TR -----> colorant diazoic (cromofor)

$\alpha$ -naftilfosfat este hidrolizat de fosfataza acidă serică în  $\alpha$ -naftol și fosfat anorganic. Viteza de hidroliză este proporțională cu activitatea enzimatică prezentă.  $\alpha$ -naftol produs este cuplat cu Fast Red TR pentru a produce un complex colorat care absoarbe lumina la 405 nm. Reacția poate fi cuantificată fotometric deoarece reacția de cuplare este instantanee. L-tartratul inhibă fosfataza acidă prostatică, dar nu interferează cu mecanismul de reacție. Prin urmare, dacă testarea este efectuată în prezența și în absența L-tartratului, diferența dintre rezultatele celor două teste este nivelul de fosfatază acidă prostatică din ser.

## Reactivi

1. Reactiv fosfatază acidă (concentrațiile se referă la reactivul reconstituit):  $\alpha$ -naftilfosfat 3mM, Fast Red TR 1mM, acid citric 20mM, citrat de sodiu 60mM, pH 5,3  $\pm$  0,1.
2. Reactiv L-tartrat (concentrațiile se referă la reactivul reconstituit): L-tartrat de sodiu 2M, acid citric 70mM, citrat de sodiu 10mM, pH 5,3  $\pm$  0,1.
3. Soluție tampon acetat: 5M, pH 5,0.

## Prepararea reactivului

1. Reconstituiți reactivul fosfatază acidă cu volumul de apă distilată menționat pe etichetă. Amestecați pentru a dizolva.

2. Reconstituiți reactivul L-tartrat cu 5,0 mL apă distilată. Încălziți reactivul pentru a favoriza dizolvarea, dacă este necesar.
3. Soluția tampon acetat este gata de utilizare.

## Depozitarea reactivului

1. Flacoanele nedeschise sunt stabile până la data expirării indicată pe eticheta flaconului, dacă sunt depozitate la frigider (2-8°C).
2. Reactivul reconstituit fosfatază alcalină este stabil timp de 24 de ore la temperatura camerei (22-28°C) și timp de 14 zile dacă este depozitat la frigider (2-8°C).
3. Reactivul reconstituit L-tartrat este stabil dacă este depozitat la frigider (2-8°C) până la data expirării indicată pe eticheta flaconului. În caz de cristalizare, încălziți la temperaturi moderate (40-50°C) până la dizolvare.
4. Soluția tampon acetat este stabilă dacă este depozitată la frigider (2-8°C) până la data expirării indicată pe eticheta flaconului.

## Deteriorarea reactivului

Reactivul nu trebuie utilizat dacă:

1. Reactivul fosfatază acidă reconstituit, fără ser adăugat, are o absorbantă mai mare de 0,300 atunci când este măsurată la 405 nm față de apă.
2. Reactivul L-tartrat este precipitat. Aplicați căldură (40-50°C) pentru a dizolva din nou reactivul.

## Precauții

Acest reactiv este doar pentru diagnostic *in vitro*.

## Recoltarea și depozitarea specimenelor

1. Utilizați doar ser transparent, nehemolizat.
2. Serul trebuie separat de coagul în două ore de la colectare.
3. Activitatea fosfatazei acide este extrem de lăbilă la temperatura camerei. Stabilizarea enzimei se poate obține doar prin acidifierea cu soluția tampon de acetat furnizată. **Adăugați 20 uL (0,02 mL) de soluție tampon per 1,0 mL de ser. Amestecați.** Probele de ser tratate vor rămâne stabile timp de 7 zile dacă sunt păstrate la frigider la 2-8°C.<sup>8</sup>
4. Nu utilizați plasmă. Anumite anticoagulante inhibă activitatea fosfatazei acide și/sau provoacă turbiditate.<sup>9</sup>

## Interacțiuni

1. Conform rapoartelor, nivelurile ridicate de bilirubină (probele icterice) inhibă activitatea fosfatazei acide determinată prin această procedură.<sup>10</sup>
2. O serie de medicamente și substanțe afectează activitatea fosfatazei acide. Young, et al<sup>11</sup> au publicat o listă cuprinzătoare.

## Materiale furnizate

1. Reactiv fosfatază acidă.
2. Reactiv L-tartrat.
3. Soluție tampon acetat.

## Materiale necesare, dar nefurnizate

1. Dispozitive de pipetare precise
2. Tuburi de testare/rack
3. Cronometru
4. Spectrofotometru capabil să măsoare la 405 nm.
5. Apă distilată/deionizată.
6. Temperatura trebuie controlată cu atenție în timpul testării. Trebuie utilizată o cuvă cu temperatură controlată (30 sau 37°C).

## Procedură (automată)

Consultați instrucțiunile aplicației specifice instrumentului.

## Procedură (manuală)

Notă: Stabilizați fosfataza acidă imediat după separarea serului de coagul prin adăugarea a 20 uL (0,02 mL) de soluție tampon acetat per 1,0 mL ser.

Amestecați și depozitați la frigider până în momentul realizării testării.

# Pointe Acid Phosphatase Set de reactivi

## A. Fosfataza acidă totală

1. Reconstituieți reactivul conform instrucțiunilor.
2. Etichetați tuburile „Soluție de control”, „Pacient” etc.
3. Pipetați 1,0 mL de reactiv în toate tuburile.
4. Setări la zero spectrofotometrul cu apă la 405 nm. Setări temperatura cuvei la 30 sau 37°C.
5. Adăugați 100 uL (0,100 mL) de probă în tubul respectiv și lăsați să incubeze timp de cinci minute.
6. După incubare, citiți și înregistrați absorbanta la intervale de un minut timp de cinci minute pentru a stabili  $\Delta A/\text{minut}$ .
7. Repetați procedura pentru fiecare probă.
8. Valorile (u/L) se obțin prin înmulțirea  $\Delta A/\text{minut}$  cu factorul. Consultați secțiunea „Calcul”.

## B. Fosfataza acidă non-prostatică

1. Adăugați 1,0 mL de reactiv în tubul etichetat corespunzător.
2. Adăugați 10 uL (0,010 mL) de reactiv L-tartrat și amestecați.
3. Setări la zero spectrofotometrul cu apă la 405 nm. Setări temperatura cuvei la 30 sau 37°C.
4. Adăugați 100 uL (0,100 mL) de probă, amestecați și incubați timp de cinci minute.
5. După incubare, citiți și înregistrați absorbanta la intervale de un minut timp de cinci minute pentru a stabili  $\Delta A/\text{minut}$ .
6. Valorile (u/L) se obțin prin înmulțirea  $\Delta A/\text{minut}$  cu factorul. Consultați secțiunea „Calcul”.

## C. Fosfataza acidă prostatică

1. Valoarea se obține prin scăderea rezultatului la testul fosfatazei acide non-prostatice (B) din rezultatul testului fosfatazei acide totale (A).

## Limitări

Probleme cu valori peste 35 u/L la 30°C sau peste 40 u/L la 37°C trebuie diluate 1:9 cu soluție salină, reprocessate, iar rezultatul final trebuie înmulțit cu 10.

## Calcul

O unitate internațională este definită drept cantitatea de enzimă care catalizează transformarea unui micromol de substrat pe minut în condiții definite.

### A. Calcularea fosfatazei acide totale.

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

### B. Calcularea fosfatazei acide non-prostatice.

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

Unde:

$10^6$  = Conversia molilor în milimoli

1,1 = Volumul total de reacție (A.P. totală)

1,11 = Volumul total de reacție (A.P. non-prostatică)

$12,9 \times 10^3$  = Absorbția molară a complexului  $\alpha$ -naftol Fast Red TR la 405 nm.

1,0 = Calea luminii în cm.

0,1 = Volumul probei (mL).

Calculule probei:

$\Delta A/\text{Min}$ . fosfataza acidă totală = 0,010

$\Delta A/\text{Min}$ . Fosfataza acidă non-prostatică = 0,009

Fosfataza acidă totală:  $0,010 \times 853 = 8,5 \text{ u/L}$

Fosfataza acidă non-prostatică:  $0,009 \times 860 = 7,7 \text{ u/L}$

Fosfataza acidă prostatică:  $8,5 - 7,7 = 0,8 \text{ u/L}$

## Controlul calității

1. Integritatea reacției trebuie monitorizată prin utilizarea unui ser de control anormal cu valori cunoscute ale fosfatazei acide.
2. Fosfataza acidă din serurile de control este mai labilă decât în serurile proaspete. Adăugați 20 uL (0,02 mL) de soluție tampon acetat per 1,0 mL de apă utilizată pentru reconstituirea serurilor de control.

## Valori așteptate

Fosfataza acidă totală: 0-9 u/L la 30°C, 2,5-11,7 u/L la 37°C

Fosfataza acidă prostatică: 0-3 u/L la 30°C, 0,2-3,5 u/L la 37°C

Valorile au fost preluate din literatura de specialitate.<sup>12</sup> Recomandăm insistent ca fiecare laborator să își stabilească propriul interval normal.

## Performanță

1. Linearitate: 35 u/L la 30°C, 40 u/L la 37°C
2. Comparatie: Un studiu realizat cu această metodă, cu un reactiv comercial cu o formulă similară, a dat următorul rezultat:

	Totală	prostatică
N= 26		
Coeficient de corelare	0,998	0,994
Ecuatie de regresie	$y=0,97x-0,40$	$y=0,97x-0,25$










## Precizie:





În cadrul ciclului de procesare (N=15)			Între ciclurile de procesare (N=15)		
Media	S.D.	C.V.%	Media	S.D.	C.V.%
8,7	0,14	1,6 (Totală)	3,7	0,28	7,6
33,3	0,29	0,9 (Totală)	7,8	0,18	2,3
7,2	0,57	7,9 (Prostatică)	32,7	0,36	1,1
29,4	0,67	2,3 (Prostatică)			

## Referințe

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).

## Legendă simboluri

 A se utiliza până la (AAAA-LL-ZZ)	 Cod lot și serie
 Număr catalog	 Producător
 Dispozitiv medical pentru diagnostic <i>in vitro</i>	 Limită de temperatură
 Consultați instrucțiunile de utilizare	<b>Rx Only:</b> Numai pentru utilizare pe bază de prescripție medicală
 Marcaj CE	 Reprezentant autorizat în Comunitatea Europeană

 A7503  Produs de HORIBA Instruments Incorporated-Pointe Brand 5449 Research Drive Canton, MI 48188  8°C 

Produs de HORIBA Instruments Incorporated – Pointe Brand  
5449 Research Drive, Canton, MI 48188

Reprezentant autorizat în Europa:

Obelis s.a.

Boulevard Général Wahis 53

1030 Bruxelles, BELGIA

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

## Certificat pentru efectuarea reactivilor

Reactivii Pointe sunt certificați ca fiind fabricați în conformitate cu parametrii specificați. Orice produs reactiv Pointe care nu îndeplinește specificațiile prin data de expirare indicată va fi remediat imediat fără niciun cost suplimentar.