

AcUso previsto

Para la determinación cuantitativa de fosfatasa ácida en suero. **Rx Only**

Importancia clínica

Se observan grandes elevaciones de la fosfatasa ácida prostática en los casos de cáncer de próstata metastásico. Dado que la fosfatasa ácida también se produce en otros tejidos, la isoenzima prostática debe distinguirse de la no prostática para un diagnóstico preciso. Se han observado niveles elevados de fosfatasa ácida no prostática en pacientes con enfermedad de Paget, hiperparatiroidismo con afectación esquelética y en cánceres que han invadido los huesos.⁷

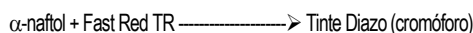
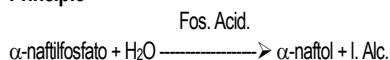
Historia del método

Los compuestos de fosfato propuestos a lo largo de los años como sustratos para medir la actividad de la fosfatasa ácida incluyen el fenilfosfato, el α -glicerolfosfato, el p -nitrofenilfosfato y el fosfato de timolfaleína. La mayoría de los sustratos anteriores eran insensibles a los pequeños aumentos en la actividad de la fosfatasa ácida prostática o eran demasiado sensibles a la fosfatasa ácida no prostática en el suero. Roy et al¹ propusieron un método utilizando monofosfato de timolfaleína sódica como sustrato específico para la fosfatasa ácida prostática en 1971. Una modificación de Ewen y Spitzer² en 1976 mejoró la sensibilidad del método de Roy. Aunque el procedimiento modificado ha encontrado una amplia aceptación, adolece de ser un procedimiento largo y tedioso además de no ser totalmente específico para la fosfatasa ácida prostática ya que también mide la fosfatasa ácida de eritrocitos y plaquetas.

En 1959, Babson et al³ propusieron el alfa-naftilfosfato como sustrato específico para la fosfatasa ácida prostática. La especificidad fue discutida por Amador⁴ en 1969.

Hilman⁵ propuso un método en 1971 que incluía 2-amino-5-clorotolueno diazotizado (Fast Red TR) que formaba un tinte diazo que absorbía fuertemente a 405 nm. Se utilizó L-Tartrato como inhibidor específico de la fosfatasa ácida prostática para establecer diferencialmente la cantidad de isoenzima prostática.⁶ El método cinético anterior es específico, rápido, simple y se puede adaptar fácilmente a la instrumentación automatizada.

Principio



El α -naftilfosfato es hidrolizado por la fosfatasa ácida sérica a α -naftol y fosfato inorgánico. La tasa de hidrólisis es proporcional a la actividad enzimática presente. El α -naftol producido se combina con el Fast Red TR para producir un complejo de color que absorbe luz a 405 nm. La reacción se puede cuantificar fotométricamente porque la reacción de acoplamiento es instantánea. El L-tartrato inhibe la fosfatasa ácida prostática pero no interfiere con el mecanismo de reacción. Por tanto, si la prueba se realiza en presencia y ausencia de L-tartrato, la diferencia entre los resultados de los dos ensayos es el nivel de fosfatasa ácida prostática en el suero.

Reactivos

1. Reactivo de fosfatasa ácida (las concentraciones se refieren al reactivo reconst.): α -naftilfosfato 3 mM, Fast Red TR 1 mM, ácido cítrico 20 mM, citrato de sodio 60 mM, pH 5,3 \pm 0,1.
2. Reactivo L-tartrato (las concentraciones se refieren al reactivo reconst.): L-tartrato de sodio 2 M, ácido cítrico 70 mM, citrato de sodio 10 mM, pH 5,3 \pm 0,1.
3. Disolución amortiguadora de acetato: 5M, pH 5,0.

Preparación de los reactivos

1. Reconstituya el reactivo de fosfatasa ácida con el volumen de agua destilada indicado en la etiqueta. Agite para disolver.
2. Reconstituya el reactivo L-tartrato con 5,0 mL de agua destilada. Caliente el reactivo para ayudar a la disolución, si es necesario.
3. La disolución amortiguadora de acetato está lista para usar.

Almacenamiento de reactivos

1. Los viales sin abrir son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial cuando se almacenan refrigerados (2-8°C).
2. El reactivo de fosfatasa ácida reconstituido es estable durante 24 horas a temperatura ambiente (22-28°C) y durante 14 días cuando se almacena refrigerado (2-8°C).
3. El reactivo L-tartrato reconstituido es estable refrigerado (2-8°C), hasta la fecha de caducidad que figura en la etiqueta del vial. Si ocurre cristalización, caliente a temperatura moderada (40-50°C) hasta que se disuelva.
4. La disolución amortiguadora de acetato es estable refrigerada (2-8°C) hasta la fecha de caducidad que figura en la etiqueta del vial.

Deterioro de los reactivos

El reactivo no debe utilizarse si:

1. El reactivo de fosfatasa ácida reconstituido, sin suero añadido, tiene una absorbancia superior a 0,300 cuando se mide a 405 nm frente al agua.
2. El reactivo L-tartrato se precipita. Aplique calor (40-50°C) para volver a disolver el reactivo.

Precauciones

Este reactivo está indicado exclusivamente para el diagnóstico *in vitro*.

Extracción y almacenamiento de muestras

1. Use solo suero límpido sin hemolizar.
2. El suero debe separarse del coágulo dentro de las dos horas posteriores a la recolección.
3. La actividad de la fosfatasa ácida es extremadamente lábil a temperatura ambiente. La estabilización de la enzima solo se puede lograr acidificando con la disolución amortiguadora de acetato suministrada. **Añada 20 μ L (0,02 mL) de disolución amortiguadora por 1,0 mL de suero. Mezcle.** Las muestras de suero tratadas permanecerán estables durante 7 días si se mantienen refrigeradas entre 2-8°C.⁸
4. No use plasma. Algunos anticoagulantes inhiben la actividad de la fosfatasa ácida y/o provocan turbidez.⁹

Interferencias

1. Al parecer, los niveles altos de bilirubina (muestras ictericas) inhiben la actividad de la fosfatasa ácida determinada por este procedimiento.¹⁰
2. Una serie de fármacos y sustancias afectan la actividad de la fosfatasa ácida. Young, et al¹¹ publicaron una lista completa.

Materiales suministrados

1. Reactivo de fosfatasa ácida.
2. Reactivo L-Tartrato.
3. Disolución amortiguadora de acetato.

Materiales necesarios, pero no suministrados

1. Dispositivos de pipeteo de precisión
2. Tubos de ensayo/gradilla
3. Temporizador
4. Espectrofotómetro capaz de leer a 405 nm.
5. Agua destilada/desionizada.
6. La temperatura debe controlarse estrictamente durante el ensayo. Se debe utilizar una cubeta de temperatura controlada (30 o 37°C).

Procedimiento (Automatizado)

Véanse las instrucciones de aplicación específicas del instrumento.

Procedimiento (manual)

Nota: Establezca la fosfatasa ácida inmediatamente después de la separación del suero del coágulo añadiendo 20 μ L (0,02 mL) de disolución amortiguadora de acetato por 1,0 mL de suero. Mezcle y almacene en el refrigerador hasta que el ensayo esté listo para realizarse.

Conjunto de reactivos Fosfatasa acida Pointe

A. Fosfatasa ácida total

1. Reconstituya el reactivo según las instrucciones.
2. Etiquete los tubos, "Control", "Paciente", etc.
3. Pipetee 1,0 mL de reactivo en todos los tubos.
4. Espectrofotómetro cero con agua a 405 nm. Ajuste la temperatura de la cubeta a 30 o 37°C.
5. Añada 100 uL (0,100 mL) de muestra al tubo respectivo y deje incubar durante cinco minutos.
6. Después de la incubación, lea y registre la absorbancia cada minuto durante cinco minutos para determinar el $\Delta A/\text{minuto}$.
7. Repita el procedimiento para cada muestra.
8. Los valores (u/L) se obtienen multiplicando el $\Delta A/\text{minuto}$ por el factor. Consulte "Cálculo".

B. Fosfatasa ácida no prostática

1. Añada 1,0 mL de reactivo al tubo debidamente etiquetado.
2. Añada 10 uL (0,010 mL) de reactivo L-Tartrato y mezcle.
3. Espectrofotómetro cero con agua a 405 nm. Ajuste la temperatura de la cubeta a 30 o 37°C.
4. Añada 100 uL (0,100 mL) de muestra, mezcle e incube durante cinco minutos.
5. Después de la incubación, lea y registre la absorbancia cada minuto durante cinco minutos para determinar el $\Delta A/\text{minuto}$.
6. Los valores (u/L) se obtienen multiplicando el $\Delta A/\text{minuto}$ por el factor. Consulte "Cálculo".

C. Fosfatasa ácida prostática

1. El valor se obtiene restando el resultado del ensayo de fosfatasa ácida no prostática (B) del ensayo de fosfatasa ácida total (A).

Limitaciones

Las muestras con valores por encima de 35u/L a 30°C, o por encima de 40u/L a 37°C, deben diluirse 1:9 con solución salina, volver a analizarse y el resultado final multiplicarse por 10.

Cálculo

Una unidad internacional se define como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micromol de sustrato por minuto en condiciones definidas.

A. Cálculo de la fosfatasa ácida total.

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

B. Cálculo de la fosfatasa ácida no prostática.

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

Donde:

- 10^6 = Conversión de moles a milimoles
- 1,1 = Volumen de reacción total (F.A. total)
- 1,11 = Volumen de reacción total (F.A. No Prost.)
- $12,9 \times 10^3$ = Absortividad molar de Complejo α -naftol Fast Red TR a 405 nm.
- 1,0 = Paso de luz en cm.
- 0,1 = Volumen de muestra (mL).

Cálculos de muestra:

- $\Delta A/\text{Min}$. fosfatasa ácida total = 0,010
- $\Delta A/\text{Min}$. Fosfatasa ácida no prostática = 0,009
- Fosfatasa ácida total: $0,010 \times 853 = 8,5 \text{ u/L}$
- Fosfatasa ácida no prostática: $0,009 \times 860 = 7,7 \text{ u/L}$
- Fosfatasa ácida prostática: $8,5 - 7,7 = 0,8 \text{ u/L}$

Control de calidad

1. La integridad de la reacción debe controlarse mediante el uso de un suero de control normal y anormal con valores conocidos de fosfatasa ácida.
2. La fosfatasa ácida en los sueros de control es más lábil que en los sueros frescos. Añada 20 uL (0,02 mL) de disolución amortiguadora de acetato por 1,0 mL de agua utilizada para reconstituir los sueros de control.

Valores esperados

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

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

Los valores se tomaron de la literatura.¹² Se recomienda enfáticamente que cada laboratorio establezca su propio rango normal.

Rendimiento

1. Linealidad: 35 u/L a 30°C, 40u/L a 37°C
2. Comparación: Un estudio realizado utilizando este método con un reactivo comercial con una formulación similar arrojó lo siguiente:

	Total	Prostática
N= 26		
Coefficiente de correlación	0,998	0,994
Ecuación de regresión	$y=0,97x-0,40$	$y=0,97x-0,25$

3. Precisión:

Intraserial (N=15)			Serie a Serie (N=15)		
Media	D.S.	% C.V	Media	D.S.	% 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)			

Referencias

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., Clin. Chem. Klin. Biochem. 3:273 (1971).
6. Fabiny-Byrd, D.L., Erlingshausen, 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).

Clave de símbolo

Usar antes de (AAAA-MM-DD)	LOT Lote y código de lote
REF Número de catálogo	Fabricante
IVD Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>	Limitación de temperatura
Consultar instrucciones de uso	Rx Only: Venta exclusiva con receta médica
Marca CE	Representante autorizado en la Comunidad Europea

REF A7503

Fabricado por
HORIBA Instruments Incorporated-Marca Pointe
5449 Research Drive Canton, MI 48188

2°C 8°C

IVD

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

Representante Europeo Autorizado:

Obelis s.a.

Boulevard Général Wahis 53

1030 Brussels, BÉLGICA

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



Certificado para emplear reactivos

Los reactivos Pointe están certificados para ser fabricados de acuerdo con los parámetros especificados. Cualquier producto de reactivo Pointe que no cumpla con las especificaciones hasta la fecha de vencimiento indicada se reparará de inmediato sin cargo.