

Uso previsto

Determinazione quantitativa della fosfatasi acida nel siero. **Solo su prescrizione.**

Interesse clinico

Nei casi di cancro prostatico metastatizzato si riscontra un forte aumento dei livelli di fosfatasi acida prostatica. Poiché la fosfatasi acida viene prodotta anche in altri tessuti, per una diagnosi accurata è necessario distinguere l'isoenzima prostatico da quello non prostatico. Livelli elevati di fosfatasi acida non prostatica sono stati osservati in pazienti con malattia di Paget, iperparatiroidismo con coinvolgimento scheletrico e in tumori con metastasi ossee.⁷

Storia del metodo diagnostico

Tra i composti fosfatici proposti nel corso degli anni come substrati per la misurazione dell'attività della fosfatasi acida, figurano il fenilfosfato, l' α -glicerolfosfato, il p -nitrofenilfosfato e il fosfato di timolfaleina. La maggior parte dei substrati sopra citati non era, però, sensibile a piccoli aumenti dell'attività della fosfatasi acida prostatica, oppure era troppo sensibile alla fosfatasi acida non prostatica presente nel siero. Nel 1971, Roy et al.¹ hanno proposto un metodo che utilizza la timolfaleina monofosfato di sodio come substrato specifico per la fosfatasi acida prostatica. Nel 1976, una modifica apportata da Ewen e Spitzer² ha migliorato la sensibilità del metodo proposto da Roy. Anche se la procedura modificata è stata ampiamente accettata, si tratta comunque di una procedura lunga e noiosa, non totalmente specifica per la fosfatasi acida prostatica; inoltre, misura anche la fosfatasi acida eritrocitaria e piastrinica.

Nel 1959, Babson et al.³ proposero come substrato specifico per la fosfatasi acida prostatica l'alfa-naftilfosfato. La specificità del composto è stata contestata da Amador⁴ nel 1969.

Nel 1971, Hilman⁵ propose un metodo che prevedeva l'utilizzo del 2-amino-5-clorotoluene diazotato (Fast Red TR) per realizzare un colorante diazoico con forte assorbimento a 405 nm. Per rilevare in modo differenziato la quantità di isoenzima prostatico veniva utilizzato il L-tartrato, in quanto inibitore specifico della fosfatasi acida prostatica.⁶ Il metodo cinetico appena descritto è specifico, rapido, semplice e può essere facilmente adattato a una strumentazione automatizzata.

Principio

fosfatasi acida

$$\alpha\text{-naftilfosfato} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\hspace{10em}} \alpha\text{-naftolo} + \text{I. fosf.}$$

$$\alpha\text{-naftolo} + \text{Fast Red TR} \xrightarrow{\hspace{10em}} \text{col. diazoico (cromoforo)}$$

L' α -naftilfosfato viene idrolizzato dalla fosfatasi acida del siero in α -naftolo e fosfato inorganico. La velocità di idrolisi è proporzionale all'attività dell'enzima presente. L' α -naftolo prodotto viene associato al Fast Red TR per ottenere un composto colorato che assorbe la luce a 405 nm. La reazione può essere quantificata fotometricamente perché è istantanea. Il L-tartrato inibisce la fosfatasi acida prostatica ma non interferisce con il meccanismo di reazione. Pertanto, se il test viene eseguito prima in presenza e poi in assenza di L-tartrato, la differenza tra i risultati dei due test individua il livello di fosfatasi acida prostatica nel siero.

Reagenti

1. Reagente per fosfatasi acida (le concentrazioni si riferiscono al reagente ricostituito): α -naftilfosfato 3mM, Fast Red TR 1mM, Acido Citrico 20mM, Sodio Citrato 60mM, pH 5,3 \pm 0,1.
2. Reagente per L-tartrato (le concentrazioni si riferiscono al reagente ricostituito): Sodio L-Tartrato 2M, Acido Citrico 70mM, Sodio Citrato 10mM, pH 5,3 \pm 0,1.
3. Tampone acetato: 5M, pH 5,0.

Preparazione dei reagenti

1. Ricostituire il reagente per fosfatasi acida con il volume di acqua distillata indicato sull'etichetta. Agitare per disciogliere in soluzione.
2. Ricostituire il reagente per L-tartrato con 5,0 ml di acqua distillata. Se necessario, riscaldare il reagente per favorirne la dissoluzione.
3. Il tampone acetato viene fornito pronto per l'uso.

Conservazione dei reagenti

1. I flaconi non aperti restano stabili fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta se conservati in frigorifero (2-8°C).
2. Il reagente per fosfatasi acida ricostituito resta stabile per 24 ore a temperatura ambiente (22-28°C) e per 14 giorni se conservato in frigorifero (2-8°C).
3. Il reagente per L-tartrato ricostituito conservato in frigorifero (2-8°C) resta stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta del flacone. In caso di cristallizzazione, riscaldare a temperature moderate (40-50°C) fino a dissoluzione.
4. La soluzione tampone acetata conservata in frigorifero (2-8°C) resta stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta del flacone.

Deterioramento dei reagenti

Non utilizzare i reagenti se:

1. Il reagente per fosfatasi acida ricostituito, senza aggiunta di siero, ha un'assorbanza superiore a 0,300 misurata a 405 nm in presenza di acqua.
2. Il reagente per L-tartrato è precipitato. In tal caso, applicare calore (40-50°C) per disciogliere nuovamente il reagente.

Precauzioni

Il reagente è destinato esclusivamente a utilizzi diagnostici *in vitro*.

Raccolta e conservazione dei campioni

1. Utilizzare solo siero limpido e non emolizzato.
2. Il siero deve essere separato dal coagulo entro due ore dal prelievo.
3. L'attività della fosfatasi acida è estremamente labile a temperatura ambiente. La stabilizzazione dell'enzima può essere ottenuta solo acidificando con il tampone acetato fornito. **Aggiungere 20ul (0,02ml) di tampone per 1,0ml di siero. Mescolare.** I campioni di siero trattati, restano stabili per 7 giorni se conservati in frigorifero a 2-8°C.⁸
4. Non usare plasma. Alcuni anticoagulanti inibiscono l'attività della fosfatasi acida e/o causano torbidità.⁹

Interferenze

1. Livelli elevati di bilirubina (campioni itterici), secondo quanto riferito, inibiscono l'attività della fosfatasi acida rilevata con questa procedura.¹⁰
2. Una serie di farmaci e sostanze interferisce con l'attività della fosfatasi acida. Young, et al¹¹ ne hanno pubblicato un elenco completo.

Materiali in dotazione

1. Reagente per fosfatasi acida.
2. Reagente per L-tartrato.
3. Tampone acetato.

Materiali necessari non in dotazione

1. Dispositivi per pipettaggio di precisione
2. Provette/rack
3. Timer
4. Spettrofotometro per la lettura a 405 nm.
5. Acqua distillata/deionizzata
6. Durante il test, la temperatura deve essere strettamente controllata. Utilizzare una cuvetta a temperatura controllata (30 o 37°C).

Procedura (automatica)

Consultare le istruzioni per l'utilizzo dello strumento.

Procedura (manuale)

Nota: stabilizzare la fosfatasi acida subito dopo la separazione del siero dal coagulo aggiungendo 20ul (0,02ml) di tampone acetato per 1,0ml di siero. Mescolare e conservare in frigorifero fino al momento dell'esecuzione del test.

A. Fosfatasi acida totale

1. Ricostituire il reagente seguendo le istruzioni.
2. Etichettare le provette: "Controllo", "Paziente", ecc.
3. Pipettare 1,0 ml di reagente in ogni provetta.

Kit reagenti per fosfatasi acida Pointe

4. Azzerare lo spettrofotometro con acqua a 405 nm. Impostare la temperatura della cuvetta a 30 o 37°C.
5. Aggiungere 100ul (0,100 ml) di campione nella provetta e lasciare incubare per cinque minuti.
6. Al termine del periodo di incubazione, leggere e registrare l'assorbanza ogni minuto per cinque minuti in modo da calcolare il $\Delta A/\text{minuto}$.
7. Ripetere la procedura per ciascun campione.
8. I valori (u/L) si ottengono moltiplicando il $\Delta A/\text{minuto}$ per il fattore indicato nel paragrafo "Calcoli".

B. Fosfatasi acida non prostatica

1. Aggiungere 1,0 ml di reagente in una provetta opportunamente etichettata.
2. Aggiungere 10ul (0,010 ml) di reagente L-tartrato e mescolare.
3. Azzerare lo spettrofotometro con acqua a 405 nm. Impostare la temperatura della cuvetta a 30 o 37°C.
4. Aggiungere 100ul (0,100 ml) di campione, mescolare e lasciare incubare per cinque minuti.
5. Al termine del periodo di incubazione, leggere e registrare l'assorbanza ogni minuto per cinque minuti in modo da calcolare il $\Delta A/\text{minuto}$.
6. I valori (u/L) si ottengono moltiplicando il $\Delta A/\text{minuto}$ per il fattore indicato nel paragrafo "Calcoli".

C. Fosfatasi acida prostatica

1. Il valore si ottiene sottraendo il risultato del dosaggio della fosfatasi acida non prostatica (B) al dosaggio della fosfatasi acida totale (A).

Limitazioni

I campioni con valori superiori a 35u/L a 30°C o superiori a 40u/L a 37°C vanno diluiti in rapporto 1:9 con soluzione fisiologica, ri-analizzati e i risultati ottenuti moltiplicati per 10.

Calcoli

Un'unità internazionale è definita come la quantità di enzima che catalizza la trasformazione di una micromole di substrato al minuto in determinate condizioni.

A. Calcolo della fosfatasi acida 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. Calcolo della fosfatasi acida non prostatica

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

con:

- 10⁶ = fattore di conversione da mole a millimole
- 1,1 = volume di reazione totale (fos.ac. totale)
- 1,11 = volume di reazione totale (fos. ac. non prostatica)
- 12,9x10³ = assorbività molare del composto α -naftolo/Fast Red TR a 405nm.
- 1,0 = percorso luce in cm
- 0,1 = volume del campione (ml).

Calcoli per campione:

$\Delta A/\text{Min}$. fosfatasi acida totale = 0,010

$\Delta A/\text{Min}$. Fosfatasi acida non prostatica = 0,009

Fosfatasi acida totale: 0,010 x 853 = 8,5 u/L

Fosfatasi acida non prostatica: 0,009 x 860 = 7,7 u/L

Fosfatasi acida prostatica: 8,5 - 7,7 = 0,8 u/L

Controllo qualità

1. La bontà della reazione va monitorata utilizzando sieri di controllo con valori normali e patologici noti di fosfatasi acida.
2. La fosfatasi acida nel siero di controllo è più labile rispetto al siero fresco. Aggiungere 20ul (0,02 ml) di tampone acetato per 1,0 ml di acqua utilizzata per ricostituire il siero di controllo.

Valori attesi

Fosfatasi acida totale: 0-9u/L a 30°C; 2,5-11,7u/L a 37°C

Fosfatasi acida prostatica: 0-3u/L a 30°C; 0,2-3,5u/L a 37°C

I valori sono stati ricavati dalla letteratura pubblicata in materiali.¹² Si raccomanda che ciascun laboratorio definisca il proprio intervallo di normalità.

Prestazioni

1. Linearità: 35 u/L a 30°C; 40u/L a 37°C
2. Comparazione: uno studio condotto con questo metodo su un reagente commerciale con una formulazione simile ha dato i seguenti risultati:

	Totale	Prostatica
N=	26	26
Coeff. di correlazione	0,998	0,994
Equazione di regressione	y=0,97x-0,40	y=0,97x-0,25

3. Precisione:

Intra-saggio (n=15)			Inter-saggio (n=15)		
Media	D.S.	C.V.%	Media	D.S.	C.V.%
8,7	0,14	1,6 (totale)	3,7	0,28	7,6
33,3	0,29	0,9 (totale)	7,8	0,18	2,3
7,2	0,57	7,9 (prostatica)	32,7	0,36	1,1
29,4	0,67	2,3 (prostatica)			

Riferimenti bibliografici

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

Utilizzare entro (aaaa-mm-gg)

N. catalogo

Dispositivo medico-diagnostico *in vitro*

Consultare il manuale utente

Marchio CE

Codice lotto e gruppo

Fabbricante

Limiti di temperatura

Rx Only: utilizzare solo su prescrizione

Rappresentante autorizzato per la Comunità Europea

A7503 Prodotto da HORIBA Instruments Incorporated - Marchio Pointe
5449 Research Drive Canton, MI 48188 2°C

Prodotto da HORIBA Instruments Incorporated - Marchio Pointe
5449 Research Drive, Canton, MI 48188

Rappresentante autorizzato per l'Europa:

Obelis s.a.

Boulevard Général Wahis 53

1030 Bruxelles, BELGIO

tel: (32)2.732.59.54 fax:(32)2.732.60.03 email: mail@obelis.net



Reagenti certificati

I reagenti Pointe sono certificati per essere stati prodotti conformemente ai parametri specificati. Se entro la data di scadenza un reagente Pointe dovesse risultare non conforme alle specifiche, sarà prontamente sostituito senza alcun addebito.