



Fosfatasa Acida

Total y Prostática cinética

Método cinético para la determinación de fosfatasas ácida total y prostática

SIGNIFICACION CLINICA

Las fosfatasas ácidas se encuentran presentes en casi todos los tejidos del organismo, siendo particularmente altas las cantidades de estas enzimas en próstata, estómago, hígado, músculo, bazo, eritrocitos y plaquetas. Las distintas isoenzimas se diferencian entre sí por su pH óptimo, peso molecular, y requerimientos de activadores e inhibidores.

La fosfatasa ácida prostática (PAP) constituye un valioso auxiliar en el diagnóstico precoz de cáncer prostático, una de las formas neoplásicas de mayor morbilidad. La determinación de la actividad enzimática de PAP usando α -naftil fosfato como sustrato ha mostrado sensibilidad y especificidad adecuadas para su utilización en el diagnóstico de esta enfermedad.

Se encuentran actividades elevadas de Fosfatasa ácida total (ACP) en algunas enfermedades hematológicas (leucemia mielocítica, trombocitopenia idiopática) y óseas (enfermedad de Paget, carcinoma óseo), así como en algunos tipos de cáncer, enfermedades hepáticas (hepatitis, ictericia obstructiva), etc.

FUNDAMENTOS DEL METODO

La fosfatasa ácida (ACP EC 3.1.3.2.) hidroliza el α -naftil fosfato a pH 5,2 con liberación de fosfato y α -naftol. El naftol reacciona a su vez con un diazorreactivo presente en el sistema (Fast Red TR) produciendo un pigmento amarillo, de modo que el aumento de la absorbancia, leído a 405 nm, es proporcional a la actividad de fosfatasa ácida total (ACP) de la muestra. Cuando se mide la actividad en presencia de tartrato, se inhibe la actividad de la isoenzima prostática. La diferencia entre las actividades de fosfatasa ácida total (ACP) y de la resistente al tartrato (Fosfatasa Acida no Prostática/ACP-NP) corresponde a la fracción prostática (PAP).

REACTIVOS PROVISTOS

- A. Reactivo A:** buffer citrato 0,1 mol/l, pH 5,2.
B. Reactivo B: viales conteniendo α -naftil fosfato 10 mmol/l y Fast Red TR 1,5 mmol/l.
C. Reactivo C: solución de tartrato 135 mmol/l en buffer citrato 100 mmol/l, pH 5,2.
D. Reactivo D: solución de ácido acético 0,7 mol/l.

REACTIVOS NO PROVISTOS

Solución fisiológica (cloruro de sodio 9 g/l).

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Fosfatasa Acida Total (FAT/ACP)

Reactivo B; preparación: disolver con el volumen de Reactivo A indicado en el rótulo. Marcar en el rótulo ACP.

Fosfatasa Acida no Prostática (FANP/ACP-NP)

Reactivo B; preparación: disolver con el volumen de Reactivo C indicado en el rótulo. Marcar en el rótulo ACP-NP.

PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".

Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de análisis clínicos.

Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Reactivos Provistos: son estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. La exposición prolongada a temperatura ambiente puede deteriorar el Reactivo B.

Reactivo B reconstituido: estable 3 días refrigerado (2-10°C) o 24 horas a temperatura ambiente (< 25°C).

INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Cuando las lecturas a 405 nm, del Reactivo B reconstituido, son mayores a 0,250 D.O., llevando el aparato a cero con agua, son indicio de deterioro del Reactivo.

MUESTRA

Suero

a) Recolección: obtener suero de la manera usual. No utilizar plasma. La fosfatasa ácida prostática es sumamente inestable "in vitro" y al pH del suero a temperatura ambiente puede perderse hasta un 50% de actividad en pocas horas. Por lo tanto debe separarse el suero del coágulo dentro de una hora de la extracción, conservándolo refrigerado (2-10°C) hasta el momento de usar.

b) Aditivos: para evitar la inactivación durante el almacenamiento puede acidificarse la muestra agregando 50 ul de Reactivo D (acético 0,7 mol/l) por cada ml de suero.

c) Sustancias interferentes conocidas:

- Sueros con marcada ictericia muestran baja recuperación de la actividad enzimática por lo que su uso debe evitarse.
- No se observa interferencia por lipemia hasta 600 mg/dl de triglicéridos, ni hemoglobina hasta 100 mg/dl.
- Los anticoagulantes interfieren en la reacción por lo que no debe emplearse plasma en la determinación.

Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: si se

emplea el conservador descrito en b) la muestra puede conservarse refrigerada (2-10°C) durante varios días sin pérdida significativa de la actividad. De lo contrario, proceder como se describe en a).

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Espectrofotómetro.
- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados.
- Cubetas espectrofotométricas de caras paralelas.
- Cronómetro.

CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda: 405 nm
- Temperatura de reacción: 37°C
- Tiempo de reacción: 3 minutos

PROCEDIMIENTO

En una cubeta mantenida a 37°C colocar:

	ACP	ACP-NP
Reactivo B ACP	1 ml	-
Reactivo B ACP-NP	-	1 ml

Preincubar unos minutos. Luego agregar:

Muestra	100 ul	100 ul

ACP: mezclar y disparar simultáneamente el cronómetro. A los 5 minutos registrar la D.O. Leer posteriormente la absorbancia cada minuto durante 3 minutos. Determinar la diferencia promedio de absorbancia/minuto ($\Delta A/\text{min}$) restando cada lectura de la anterior y promediando los valores. Utilizar este promedio para los cálculos ($\Delta A_1/\text{min}$).

ACP-NP: proceder de la misma manera que para ACP. Se obtiene el $\Delta A_2/\text{min}$.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

Fosfatasa Acida Total (ACP) = $\Delta A_1/\text{min} \times 743 = (U/l_1)$

Fosfatasa Acida no Prostática (ACP-NP) = $\Delta A_2/\text{min} \times 743 = (U/l_2)$

Fosfatasa Acida Prostática (PAP) (U/l) = $U/l_1 - U/l_2$

VALORES DE REFERENCIA

Fosfatasa Acida Total (ACP): < 9 U/l (a 37°C)

Fosfatasa Acida Prostática (PAP): < 3,5 U/l (a 37°C)

La actividad de ACP es muy escasa en el hombre sano y casi nula en la mujer, de modo que los valores esperados se encuentran en el límite del error instrumental o muy cercanos al límite de detección del sistema. No obstante se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.
- Las enzimas son sensibles a la acción de ciertos contaminantes y venenos enzimáticos (metales pesados, cianuros, tensioactivos, etc.) por lo que se recomienda extremar las

precauciones en la limpieza del material empleado en la extracción de muestras y en la determinación.

- Alteraciones iatrogénicas: existen algunos medicamentos que pueden afectar los valores plasmáticos de PAP, así como el masaje, cateterismo y otras manipulaciones prostáticas por lo que es conveniente interrogar al paciente o al médico tratante sobre toda medicación, tratamiento o procedimiento diagnóstico a que esté sujeto el paciente.
- El diagnóstico clínico no debe realizarse teniendo en cuenta el resultado de un único ensayo, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

METODO DE CONTROL DE CALIDAD

Procesar con cada determinación, dos niveles de un material de control de calidad (**Standatrol S-E 2 niveles**) con actividades conocidas de fosfatasas ácida total y prostática.

PERFORMANCE

a) Reproducibilidad: se aplicó el protocolo EP15A del CLSI. Se analizaron dos niveles de actividad, cada uno por cuadruplicado durante 5 días, en analizador automático. Con los datos obtenidos, se calculó la precisión intraensayo y total.

Fosfatasa Acida Total

Precisión Intraensayo

Nivel	D.S.	C.V.
23,7 U/l	± 0,400 U/l	1,7 %
45,2 U/l	± 0,575 U/l	1,3 %

Precisión Total

Nivel	D.S.	C.V.
23,7 U/l	± 0,480 U/l	2,0 %
45,2 U/l	± 0,872 U/l	1,9 %

Fosfatasa Acida No Prostática

Precisión Intraensayo

Nivel	D.S.	C.V.
11,6 U/l	± 0,307 U/l	2,7 %
24,5 U/l	± 0,718 U/l	2,9 %

Precisión Total

Nivel	D.S.	C.V.
11,6 U/l	± 0,351 U/l	3,0 %
24,5 U/l	± 0,776 U/l	3,2 %

b) Linealidad: la reacción es lineal hasta 74 U/l ($\Delta A/\text{min} = 0,100$ D.O.). Para valores superiores repetir la determinación con muestra diluida (0,1 ml muestra + 0,2 ml solución fisiológica), multiplicando el resultado obtenido por 3.

c) Límite de detección: la mínima actividad detectable es 0,51 U/l para la fosfatasa ácida total y 0,48 U/l para la fosfatasa ácida no prostática.

PRESENTACION

- 40 ml (Cód. 1351402): - 1 x 40 ml Reactivo A
- 20 x 2 ml Reactivo B
- 1 x 40 ml Reactivo C
- 1 x 5 ml Reactivo D

BIBLIOGRAFIA

- Hillmann, G.Z. - Klin. Chem. Klin. Biochem. 9:273 (1971).
- Skelley, D.S. - Ligand Rev. 2/1:43 (1980).
- Shaw, L.M.; Brummund, W.; Dorio, R.J. - Am. J. Clin. Pathol. 68/1:57 (1977).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4th ed., (2001)
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (ex-NCCLS) - Protocols EP 15A, 2001 / EP 17A, (2004).
- Junge,W.; Thormeyer, I.; Schlottmann A. et al - 3rd Alpe-Adria Congress on Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, September 7-9 (1994).

SIMBOLOS

Los siguientes símbolos se utilizan en todos los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab.

 Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"

 Representante autorizado en la Comunidad Europea

 Uso diagnóstico "in vitro"

 Contenido suficiente para <n> ensayos

 Fecha de caducidad

 Límite de temperatura (conservar a)

 No congelar

 Riesgo biológico

 Volumen después de la reconstitución

 Contenido

 Número de lote

 Elaborado por:

 Nocivo

 Corrosivo / Caústico

 Irritante

 Consultar instrucciones de uso

 Calibrador

 Control

 Control Positivo

 Control Negativo

 Número de catálogo

 Wiener Laboratorios S.A.I.C.
Riobamba 2944
2000 - Rosario - Argentina
<http://www.wiener-lab.com.ar>
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola
Bioquímica
Producto Autorizado A.N.M.A.T.
Cert. N°: 5781/06



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina

860202200 / 00 Pág. 3 de 6