

**REACTIVO PARA FOSFATASA ACIDA****USO:**

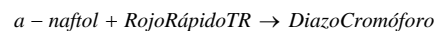
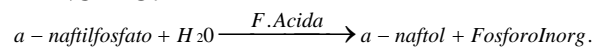
Para la determinación cuantitativa de Fosfatasa Acida en suero.

**HISTORIA DEL METODO:**

Los compuestos fosfatados propuestos a través de los años como substratos para medir la actividad de la Fosfatasa Acida incluyen Fenilfosfatos,  $\alpha$ -glicerolfosfato, p-Nitrofenilfosfato y Timolfaleina fosfato. La mayoría de los substratos fueron insensibles a pequeños aumentos en la actividad de Fosfatasa Acida Prostática, o eran muy sensibles a la Fosfatasa Acida No Prostática en el suero. Roy et al(1) propuso un método utilizando Monofosfato sodico de Timolfaleina como substrato específico para Fosfatasa Acida Prostática en 1971. Una modificación por Ewen y Spitzer en 1976 mejoró la sensibilidad del método de Roy.

Aunque el procedimiento modificado ha sido aceptado, es un largo y tedioso procedimiento y no es totalmente específico para la Fosfatasa Acida medida en eritrocitos y plaquetas, en 1959 Babson propuso el Alfa - naftilfosfato como substrato específico para Fosfatasa Acida Prostática su especificidad fué disputada por Amador en 1969.

Hillman propuso un método en 1971 que incluía 2 Amino 5 Clorotolueno Diazotizado (rojo rápido) que forman un compuesto diácido que absorbía a 405 nm. L-Tartrato fué usado como un inhibidor específico de Fosfatasa Acida Prostática para establecer diferencialmente la cantidad de Isoenzima Prostática. Este método cinético es específico, rápido, simple y puede ser adaptado fácilmente a instrumentos automatizados.

**PRINCIPIO:**

A-Naftilfosfato es hidrolizado por la Fosfatasa Acida del suero a a-naftol y fosfato inorganico. El rango de hidrólisis es proporcional a la actividad de la enzima presente.

El A-Naftol producido es unido al rojo rápido para producir un complejo coloreado que absorbe a 405 nm. la reacción puede ser cuantitativa fotométrica ya que la reacción es instantánea.

L-Tartrato inhibe la Fosfatasa Acida Prostática pero no interfiere con el mecanismo de reacción. Por lo tanto la prueba se hace en presencia y/o ausencia del tartrato. la diferencia entre los resultados es el nivel de Fosfatasa Acida Prostática en suero.

**SIGNIFICADO CLINICO:**

Los niveles elevados de Fosfatasa Acida Prostática se encuentran en casos de cancer metastásico de próstata. Ya que la Fosfatasa Acida también se produce en otros tejidos, la isoenzima prostática puede ser distinguida de la no prostática por diagnóstico preciso. Los niveles elevados de Fosfatasa Acida No-Prostática se han observado en pacientes con el mal de Paget's, Hiperparatiroidismo con participación esquelética y cancer que ha invadido los huesos.

**REACTIVOS:**

1. Reactivo Fosfatasa Acida: La concentración se refiere al reactivo Naftilfosfato 3mM. Rojo rápido 1mM, Acido cítrico 20 mM. Citrato de Sodio 10 mM. PH 5.3  $\pm$  0.1.

2. Reactivo L-Tartrato (la concentración se refiere al reactivo reconstituido): L-Tartrato de Sodio 2 mM. Acido Cítrico 70 mM, Citrato de Sodio 10 mM. PH 5.3  $\pm$  0.1
3. Buffer de Acetato: 5M. PH 5.0

**PRECAUCIONES:**

1. Este reactivo es para uso "In Vitro" solamente.

**PREPARACION DEL REACTIVO:**

1. Reconstituya el reactivo de Fosfatasa Acida 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, agite el reactivo para ayudar a disolver si es necesario.
3. El buffer de Acetato, esta listo para usarse.

**ALMACENAMIENTO DEL REACTIVO:**

1. Los viales cerrados son estables hasta la fecha de expiración indicada en la etiqueta del vial refrigerados (2-8)°C.
2. El reactivo de Fosfatasa Acida es estable 24 hrs. a temperatura ambiente (22-28°C) y por 14 días si se refrigera (2-8°C)
3. El reactivo reconstituido de L-Tartrato es estable refrigerado (2-8°C) hasta la fecha de expiración indicada en la etiqueta. Si ocurre cristalización, caliente a temperatura moderada (40-50 °C) hasta disolver.
4. El buffer de acetato es estable en refrigeración (2-8 °C) hasta la fecha de expiración indicada en la etiqueta.

**DETERIORO DEL REACTIVO:****NO SE USE SI:**

1. El reactivo de Fosfatasa Acida reconstituido añadido al suero tiene una absorbancia mayor que 0.300 medido a 405 nM, contra agua.
2. El L-Tartrato este precipitado, aplique calor para disolver el reactivo (40-50 °C).

**RECOLECCION Y ALMACEN DE LA MUESTRA:**

1. Utilice solo suero claro y no-hemolizado.
2. El suero debe ser separado del coagulo en las 2 horas despues de la toma de muestra.
3. La actividad de la Fosfatasa Acida es extremadamente sensible a temperatura ambiente. La estabilización de la enzima se obtiene acidificando con el Buffer de Acetato. Agregue 20 uL (0.02 ml) de
4. Buffer por 1 ml. de suero, mezcle. Las muestras de suero tratadas permacerán estables por 7 días si se mantienen refrigeradas a 2-8 °C.
5. No utilice plasma. Algunos anticoagulantes inhiben la actividad de la Fosfatasa Acida o causan turbiedad.

**INTERFERENCIAS:**

1. Los altos niveles de bilirrubina (muestra ictericas) reportados, inhiben la actividad de la Fosfatasa Acida determinada por este procedimiento.
2. Varias drogas y substancias afectan la actividad de la Fosfatasa Acida. Young ha publicado una lista de estas.

**MATERIALES PROPORCIONADOS:**

1. Reactivos de Fosfatasa Acida
2. Reactivo L-Tartrato
3. Buffer Acetato

## MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROPORCIONADOS:

1. Gradilla para tubos de pruebas
2. Instrumentos precisos de pipeteo
3. Agua deionizada y destilada.
4. Cronómetro.
5. Espectrofotometro capaz de leer a 405 nm.
6. temperatura controlada durante la prueba , una cubeta con temperatura controlada debe ser utilizada a 30°C.

## PROCEDIMIENTO AUTOMATIZADO:

Referirse a las aplicaciones especificas del instrumento.

## PROCEDIMIENTO MANUAL:

Eatabilice la fosfatasa Acida inmediatamente después de la separación del suero del coágulo agregando 20ul. de Buffer de Acetato por 1.0 ml. de suero, mezcle y almacene refrigeración hasta que se efectúe la prueba.

### A) FOSFATASA ACIDA TOTAL:

1. Reconstituya el reactivo de acuerdo a instrucciones
2. Etiqueta tubos control, paciente, etc
3. Pipete 1.0 ml. de reactivo en todos los tubos.
4. Calibre a cero el espectrofotómetro con agua a 405 nm. con cubeta a 30°C.
5. Agregue 100 UL. (0.010ml.) de muestra en los tubos respectivos e incube a 30°C por 5 minutos.
6. Después de la incubación, lea y anote la absorbancia cada minuto por cinco minutos para determinar la  $\Delta\Delta/\text{min}$ .
7. Repita el procedimiento para cada muestra.
8. Los valores se obtienen multiplicando la  $\Delta\Delta/\text{min}$ . por el factor (ver cálculos).

### B) FOSFATASA NO PROSTATICA:

1. Agregue 1.0 ml. de reactivo en el tubo propiamente etiquetado.
2. Agregue 10 UL. (0.010 ml.) de L-Tartrato y mezcle.
3. Calibre el espectrofotómetro en cero con agua a 405 nm. en una cubeta a 30°C de temperatura.
4. Agregue 100 ul. (0.100 ml.) de muestra, mezcle e incube a 30°C por 5 minutos
5. Después de la incubación lea y anote la absorbancia cada minuto durante 5 minutos para determinar la  $\Delta\Delta/\text{min}$ .
6. Los valores (U/L) se obtienen multiplicando la  $\Delta\Delta/\text{min}$ . por el factor. (ver cálculos)

### C) FOSFATASA ACIDA PROSTATICA:

1. El valor se obtiene restando el resultado de la prueba de la Fosfatasa Acida No Prostática(B) de la prueba de la fosfatasa Acida Total(A).

## CONTROL DE CALIDAD:

La integridad de la reacción debe ser monitoreada por el uso de suero de control normal y anormal con un valor de Fosfatasa Acida conocido.

## CALCULOS:

La unidad internacional es definida como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micro mol de sustrato por minuto bajo condiciones definidas

## DONDE:

- $10^6$  = Conversación de moles a milimoles.  
1.1 = Volumen total de la reacción (p.A. total).  
1.11 = Volumen total de la reaccion (p.A. No prostática)  
1.10 = Patrón de luz en cm  
0.1 = Volumen de muestra (ml).  
 $12.9 \times 10^3$  = Absorción molar del complejo naftol Rojo Rápido a 405 nm.

## CALCULOS DE MUESTRA:

$\Delta\Delta/\text{MIN}$ =Fosfatasa Acida Total=0.010

$\Delta\Delta/\text{MIN}$ =Fosfatasa Acida No Prostática=.009

Fosfatasa Acida Total=0.010x853=8.5U/L:

Fosfatasa Acida No Prostática=.009x860=7.7 U/L

Fosfatasa Acida Prostática=8.5-7.7=0.8 U/L

## LIMITACIONES:

Las muestras con valores arriba de 35 UL a 30°C diluirlas con solución salina 1:9, volver a correr y el resultado final multiplicarlo por 10.

## VALORES ESPERADOS:

Fosfatasa Acida Total : 0-9 u/L.

Fosfatasa Acida Prostatica : 0-3 u/L

## DESEMPEÑO:

1. Linearidad: 35 u/L a 30°C
2. Comparación: Un estudio realizado con este metodo, con un reactivo comercial con formula similar resultó en lo siguiente N=26.

	Total	Prostática
Correlación Coeficiente	0.998	0.994

Ecuación de Regresión:  $y=0.97x - 0.40$   $y=0.97x - 0.25$

3. Precisión:

	Entre pruebas (N=15)			
	TOTAL		PROSTATICA	
Conc.(u/L)	8.7	33.3	7.2	29.4
S.D.	0.14	0.29	0.57	0.67
C.V:%	1.6	0.9	7.9	2.3
	Prueba a Prueba (N=15)			
Conc.(u/L)	3.7	7.8	32.7	
S.D.	0.28	0.18	0.36	
C.V.%	7.6	2.3	1.1	

## REFERENCIAS:

1. Roy, Av., etal Quimica Clinica 17:1093 (1971)
2. Ewen, L.M., Spitzer, R.W. Quimica Clinica 22:627 (1976)
3. Babson, A.L. et al, AM. Patologia Clinica 32:83 (1989)
4. Amador, E., etal, AM. J. Patologia Clinica 51:202 (1969)
5. Hillman, G.Z. Klin diem. Klin. Bioquimica 3:273 (1971)
6. Fabiny-Byrd. D.I. Ertinghausen, G. Quimica Clinica 13:841 (1992)
7. Tietz. N.W. Fundamentos de Quimica Clinica Philadelphia, W.B. Saunders, P. 614 (1976).
8. Ellis, G., et al J. Clin Chem. Prin. and Tech, Hoeber, New York (1964).
9. Shaw, L.M., et al, Clin. Chem, 21. No. 5(1975).
10. Young, D.S. et al, Clin Chem, 21 No. 5(1975)
11. Tietz N.W., Fund. of Clin, Chem, Philadelphia, W.B. Saunders, p. 618 (1976). REV. 2/91



**DISTRIBUOTOR:**  
**MYM Laboratory & Medical Supply, Inc.**  
8684 Ave. de la Fuente Ste. 14  
San Diego CA. 92154  
Tel. (619) 710-0126 Fax. (619) 710-0297  
www.mymssupply.com  
email: mail@mymssupply.com