

## JUEGO DE REACTIVOS PARA FOSFATASA ACIDA (MÉTODO CINÉTICO)

### JUEGO DE REACTIVOS PARA FOSFATASA ACIDA.

Uso destinado: Para determinación Cuantitativa de la fosfatasa acida en suero.

### INTRODUCCIÓN

La actividad de la fosfatasa ácida no-específica es ampliamente distribuida en el organismo. Esta enzima secretada por la glándula de la próstata humana ha traído la mayor atención, debido a su importancia clínica, y la caracterización extensa y los estudios estructurales que se han llevado a cabo en él. Puesto que la fosfatasa ácida también se produce en otros tejidos. La isoenzima prostática debe distinguirse de la no-prostática para el diagnóstico exacto. Niveles elevados de fosfatasa ácida no-prostática se han observado en pacientes con enfermedad de Paget, hiperparatiroidismo con compromiso del esqueleto, y en cánceres que han invadido los huesos.

Se han propuesto numerosos compuestos de fosfatos como substratos para medir la actividad de la fosfatasa ácida, como fenilfosfato, p-nitrofenilfosfato, fosfato de timolnaflaleina. El  $\alpha$ -naftilfosfato fue propuesto por Babson como un substrato específico para la fosfatasa ácida prostática. Sin embargo, Amador demostró que este compuesto puede ser hidrolizado por enzimas derivadas de tejidos. Hilman propuso un método en 1791 que incluía 2-amino-5-clorotolueno (TR rojo rápido) diazotizado que formaba un tinte diazo que se absorbió firmemente a 405nm. L-tartrate fue usado como un inhibidor específico de fosfatasa ácida prostática. El método dinámico ya mencionado es específico, rápido, simple, y puede adaptarse fácilmente a instrumentación automatizada.

### PRINCIPIOS

$\alpha$ -naftilfosfato + H<sub>2</sub>O       $\alpha$ -naftol + fósforo Inorgánico  
 $\alpha$ -naftol + TR rojo rápido      tinte diazo (cromoforo)

el  $\alpha$ -naftol liberado del substrato de  $\alpha$ -naftilfosfato de la fosfatasa ácida se acopla con TR rojo rápido para producir un complejo coloreado que absorbe la luz a 405 nm. La reacción puede ser cuantificada fotométricamente porque la reacción de acoplamiento es instantánea.

L-tartrate inhibe la fosfatasa ácida prostática pero no interfiere con el mecanismo de reacción. Por consiguiente, si la prueba se realiza con la presencia y en la ausencia de L-tartrate, la diferencia entre los resultados de los dos ensayos es el nivel de fosfatasa ácida prostática en suero.

### REACTIVO

1. Reactivo de fosfatasa ácida (Concentraciones se refieren al reactivo constituido):  $\alpha$ -Naftilfosfato 3 mM, Citrato de sodio 60 mM, pH 5.3  $\pm$  0.1.
2. Reactivo de L-Tartrate (concentraciones se refieren al reactivo constituido): L-Tartrate de sodio 2 M, ácido cítrico 70 mM, Citrato de sodio 10 mM, pH 5.3  $\pm$  0.1.

3. Buffer de acetato: 5 M, pH 5.0.

### PRECAUCIONES

Los reactivos son para diagnóstico In-Vitro.

### PREPARACION DEL REACTIVO

1. Reconstituya el reactivo de fosfatasa ácida con el volumen de agua destilada establecido en la etiqueta del frasco. Agítese para disolver.
2. Reconstituya el reactivo de L-Tartrate con 5.0 ml de agua destilada. Caliente el reactivo para ayudar en la disolución, si es necesario.
3. El acetato buffer está listo para usar.

### ALMACENAMIENTO DEL REACTIVO Y ESTABILIDAD

1. Los frascos sin abrir son estables hasta la fecha de expiración declarada en la etiqueta del frasco, cuando se guarda en refrigeración (2 – 8°C).
2. El reactivo de fosfatasa ácida reconstituido es estable durante un día a temperatura ambiente (22 – 28°C) y durante siete días cuando se guarda en refrigeración a 2 – 8°C.
3. El reactivo de L-Tartrate reconstituido es estable refrigerado a 2 – 8°C hasta la fecha de expiración que aparece en la etiqueta del frasco. Si la cristalización del componente ocurre, caliente a temperatura moderada (40 – 50°C) hasta que se disuelva.  
La solución de acetato de buffer es estable cuando se refrigera a 2 – 8°C hasta la fecha de expiración que aparece en la etiqueta del frasco.

### DETERIORO DEL REACTIVO

El reactivo no debe usarse si:

1. El reactivo de fosfatasa ácida reconstituido, sin suero agregado, tiene una absorbancia mayor que 0.4 cuando se ha medido a 405 nm contra agua.
2. Si el reactivo de L-Tartrate se precipita, aplique calor (40 – 50°C) al reactivo para volver a disolver.

### RECOLECCION DE LA MUESTRA Y ALMACENAMIENTO

1. Use sólo suero no hemolizado.
2. Debe separarse el suero del coágulo dentro de dos horas después de la recolección.
3. La actividad de la fosfatasa ácida es sumamente débil a temperatura ambiente. La estabilización de la enzima sólo puede ser lograda acidificando con el acetato de buffer proporcionado. Agregue 20  $\mu$ l (0.02 ml) de buffer por 1.0 ml de suero. Mezclar. Las muestras de suero tratadas permanecerán estables durante siete días en refrigeración de 2 – 8°C.

4. No use plasma. Algunos anticoagulantes inhiben la actividad de la fosfatasa ácida y causan turbiedad.

#### INTERFERENCIAS

1. Niveles altos de bilirrubina (muestras ictericas) según informes recibidos inhiben la actividad determinada de la fosfatasa ácida por este procedimiento.
2. Varias drogas y sustancias afectan la actividad de la fosfatasa ácida. Young ha publicado una lista comprensiva.

#### MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS.

1. Tubos de ensayo y portatubos.
2. Pipetas de precisión.
3. Agua destilada.
4. Cronómetro.
5. Espectrofotómetro capaz de leer a 405 nm.
6. Debe controlarse la temperatura cuidadosamente durante el ensayo. Una temperatura controlada de (37°C) debe usarse en la cubeta del espectrofotómetro.

#### PROCEDIMIENTO (AUTOMATIZADO)

Vea las instrucciones del instrumento a utilizarse.

#### PROCEDIMIENTO (MANUAL)

Nota: Estabilice la fosfatasa ácida inmediatamente después de la separación del suero del coágulo separando 20 µl (0.02 ml) de buffer de acetato por 1.0 de suero. Mezcle y guarde en refrigeración hasta que el ensayo sea realizado.

#### A. FOSFATASA ÁCIDA TOTAL

1. Reconstituya el reactivo de acuerdo a las instrucciones.
2. Rotule los tubos, "Control", "Paciente", etc.
3. Pipetee 1.0 ml de reactivo en todos los tubos.
4. Ponga a cero el espectrofotómetro con agua a 405 nm. Prepare la temperatura de la cubeta a (37°C).
5. Agregue 100 µl (0.10 ml) de muestra al tubo respectivo con reactivo y ponga a incubar a 37°C durante cinco minutos.
6. Después de la incubación, lea y grabe la absorbancia a cada minuto durante cinco minutos, para determinar la  $\Delta\text{Abs./min}$ .
7. Repita el procedimiento para cada muestra.
8. Valores ( $\mu\text{L}$ ) son obtenidos multiplicando la  $\Delta\text{Abs./min}$  por el factor. Vea "Cálculos".

#### B. FOSFATASA ÁCIDA NO PROSTÁTICA

1. Agregue 1.0 ml de reactivo al tubo apropiadamente etiquetado.
2. Agregue 10 µl (0.01 ml) de reactivo de L-Tartrate y mezcle.
3. Ponga a cero el espectrofotómetro con agua a 405 nm. Prepare la temperatura de la cubeta a 37°C durante cinco minutos.
4. Agregue 100 µl (0.10 ml) de muestra, mezcle e incube a 30°C durante cinco minutos.
5. Después de la incubación, lea y grabe la absorción a cada minuto durante cinco minutos para determinar la  $\Delta\text{Abs./min}$ .
6. Valores ( $\mu\text{L}$ ) son obtenidos multiplicando la  $\Delta\text{Abs./min}$  por el factor. Vea "Cálculos".

#### C. FOSFATASA ÁCIDA PROSTÁTICA

El valor es obtenido substrayendo el resultado del ensayo de fosfatasa ácida no prostática (B) para el ensayo de fosfatasa ácida total (A).

#### CONTROL DE CALIDAD.

1. La integridad de la reacción debe ser supervisada por el uso de un suero control con valores conocidos de fosfatasa ácida en rango normal y anormal
2. El control de fosfatasa ácida en suero es más débil que en suero fresco. Agregue 20 µl (0.02 ml) de buffer de acetato por 1.0 ml de agua usada para reconstituir el suero de control.

#### CALCULOS

Una unidad internacional se define como la cantidad de enzimas catalizadoras que transforman un micromol de sustrato por minuto bajo condiciones definidas.

1. Cálculo de fosfatasa ácida total  
 $\Delta\text{Abs./min} \times 106 \times 1.1 - \mu\text{L} - \Delta\text{Abs./min} \times 853$   
 $12.9 \times 103 \times 1.0 \times 0.1$
2. Cálculo de fosfatasa ácida no prostática.  
 $\Delta\text{Abs./min} \times 106 \times 1.1$