



Método cinético optimizado (DGKC y SSCC) a 405 nm,
para la determinación de fosfatasa alcalina

SIGNIFICACION CLINICA

La fosfatasa alcalina es una enzima ampliamente distribuida en el organismo. Hidroliza los monoésteres del ácido ortofosfórico en medio alcalino.

En el adulto proviene en parte del hígado (fracción termoestable) y en parte del hueso, sistema reticuloendotelial y vascular (fracción termolábil), dando lugar a distintas isoenzimas. La actividad sérica de fosfatasa alcalina ósea, en condiciones normales, alcanza su mayor actividad en los niños en edad de crecimiento (llegando a triplicar los niveles del adulto) debido a que esta isoenzima se localiza en los osteoblastos (relacionados con la calcificación y formación de estructuras óseas). También es fisiológico el aumento que se produce al final del primer trimestre del embarazo, a expensas de la isoenzima placentaria que en este período alcanza niveles máximos (aproximadamente el doble de los valores normales).

Entre las patologías que afectan la actividad sérica de fosfatasa alcalina, se pueden citar: carcinomas metastásicos en hígado y en hueso (productores de enzima), colestasis biliar, fenómenos osteoblásticos, trastornos de malabsorción acompañados de lesiones ulcerosas (donde la deficiencia de vitamina D produce osteomalacia con el consecuente aumento de fosfatasa alcalina ósea) e incluso lesiones en vías de reparación tales como infarto agudo de miocardio, infarto pulmonar o renal.

FUNDAMENTOS DEL METODO

La fosfatasa alcalina (ALP o monoéster ortofosfórico fosfohidrolasa, EC. 3.1.3.1.) hidroliza al p-nitrofenilfosfato (p-NFF), que es incoloro, produciendo fosfato y p-nitrofenol a pH alcalino. La velocidad de aparición del anión p-nitrofenolato (amarillo) a 405 nm, es proporcional a la actividad enzimática de la muestra.

REACTIVOS PROVISTOS

A. Reactivo A: solución de buffer DEA (dietanolamina), conteniendo sales de magnesio.

B. Reactivo B: solución conteniendo p-nitrofenil fosfato (p-NFF).

Concentraciones finales

DEA 1,0 mol/l
Mg..... 0,5 mmol/l
p-NFF 10 mmol/l

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Reactivos Provistos: listos para usar. Estos pueden usarse separados o como **Reactivo único**, mezclando 4 partes de

Reactivo A con 1 parte de Reactivo B (ej.: 4 ml Reactivo A + 1 ml Reactivo B).

INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Cuando el espectrofotómetro es llevado a cero con agua destilada, lecturas de absorbancia del Reactivo único (premezclado) superiores a 0.900 D.O. son indicio de deterioro del mismo.

PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".

Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de química clínica.

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. Una vez abiertos, no deben permanecer destapados y fuera del refrigerador por períodos prolongados. Evitar contaminaciones.

Reactivo único (premezclado): estable 1 mes en refrigerador (2-10°C) a partir de la fecha de su preparación.

MUESTRA

Suero o plasma heparinizado

a) Recolección: se debe obtener suero de la manera usual.

b) Aditivos: en caso de que la muestra a emplear sea plasma, debe usarse heparina como anticoagulante.

c) Sustancias interferentes conocidas:

- No se observan interferencias por bilirrubina hasta 16 mg/dl, lípidos hasta 1000 mg/dl de triglicéridos, ni heparina hasta 50 UI/ml.

- Hemólisis moderadas (hasta 200 mg/dl) no producen interferencias pero hemólisis muy intensas pueden producir variaciones en los resultados.

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

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: emplear suero preferentemente fresco. En caso de no efectuarse el ensayo dentro de las 6 horas posteriores a su obtención, la muestra debe conservarse congelada (-20°C).

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Espectrofotómetro.

- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados.

- Cubetas espectrofotométricas de caras paralelas.
- Baño de agua a la temperatura de reacción seleccionada.
- Cronómetro.

CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda: 405 nm
- Temperatura de reacción: 25, 30 ó 37°C. Ver los VALORES DE REFERENCIA correspondientes a cada temperatura.
- Tiempo de reacción: 3 minutos y 20 segundos
- Volumen de muestra: 10 ul

Los volúmenes de muestra y de Reactivo pueden variarse proporcionalmente, sin que se alteren los factores de cálculo.

PROCEDIMIENTO I

TECNICA CON REACTIVO UNICO

En una cubeta mantenida a la temperatura de reacción seleccionada colocar:

Reactivo único	1,0 ml
-----------------------	--------

Preincubar unos minutos. Luego agregar:

Muestra	10 ul
----------------	-------

Mezclar inmediatamente y disparar simultáneamente el cronómetro. Esperar 20 segundos y leer la absorbancia inicial. Registrar la absorbancia luego de 1, 2 y 3 minutos de la primera lectura. Determinar la diferencia promedio de Absorbancia/min ($\Delta A/\text{min}$), restando cada lectura de la anterior y promediando los valores. Utilizar este promedio para los cálculos.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

Fosfatasa alcalina (U/l) a 405 nm = $\Delta A/\text{min} \times 5.460$

PROCEDIMIENTO II

TECNICA CON REACTIVOS SEPARADOS

En una cubeta mantenida a la temperatura de reacción seleccionada colocar:

Reactivo A	1,0 ml
-------------------	--------

Muestra	10 ul
----------------	-------

Preincubar unos minutos. Luego agregar:

Reactivo B	0,25 ml
-------------------	---------

Mezclar inmediatamente y disparar simultáneamente el cronómetro. Esperar 20 segundos y leer la absorbancia inicial. Registrar la absorbancia luego de 1, 2 y 3 minutos de la primera lectura. Determinar la diferencia promedio de Absorbancia/min ($\Delta A/\text{min}$), restando cada lectura de la anterior y promediando los valores. Utilizar este promedio para los cálculos.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

Fosfatasa alcalina (U/l) a 405 nm = $\Delta A/\text{min} \times 6.812$

METODO DE CONTROL DE CALIDAD

Procesar 2 niveles de un material de control de calidad (**Standatrol S-E 2 niveles**) con actividades conocidas de fosfatasa alcalina, con cada determinación.

VALORES DE REFERENCIA

En adultos normales (edades entre 20 y 60 años) se observan los siguientes rangos:

Temperatura	25°C	30°C	37°C
Valores en adultos (U/l)	40-190	45-213	65-300

Debido al proceso osteoclástico, la isoenzima ósea se encuentra aumentada en la niñez y adolescencia (hasta los 18 años, aproximadamente) proporcionando valores de fosfatasa alcalina más elevados que en los adultos. En condiciones normales se consideran los siguientes valores límites:

Temperatura	25°C	30°C	37°C
Valores en niños y adolescentes (U/l)	hasta 400	hasta 450	hasta 645

La IFCC recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia eligiendo grupos de personas en base a criterios establecidos, acorde con el contexto de su población.

CONVERSION DE UNIDADES AL SISTEMA SI

ALP (U/l) x 0,017 = ALP (ukat/l)

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.

Los anticoagulantes comunes (tales como EDTA disódico, oxalato, citrato o fluoruro) producen inhibición de la actividad de fosfatasa alcalina.

El reactivo puede colorearse en presencia de trazas de soluciones de limpieza a base de hipoclorito. Asegurarse de enjuagar abundantemente con agua desmineralizada todo el material que pueda estar en contacto con hipoclorito, incluyendo las agujas y conexiones de los analizadores, cuando se emplea la técnica automática.

PERFORMANCE

Los ensayos fueron realizados en analizador Express Plus^(*)

a) Reproducibilidad: procesando de acuerdo al documento EP15-A del CLSI (ex-NCCLS), se obtuvo lo siguiente:

Precisión intraensayo

Nivel	D.S.	C.V.
119 U/l	± 2,6 U/l	2,2 %
347 U/l	± 2,6 U/l	0,7 %

Precisión total

Nivel	D.S.	C.V.
119 U/l	± 2,9 U/l	2,4 %
347 U/l	± 3,2 U/l	0,9 %

b) Linealidad: la reacción es lineal hasta 1.500 U/l. Para

^(*) Marca registrada de Ciba Corning Diagnostics

valores superiores debe repetirse la determinación, previa dilución del suero 1/5 ó 1/10 con solución fisiológica. Corregir los cálculos multiplicando por el factor de dilución empleado.

c) Límite de detección: el mínimo cambio de actividad detectable de ALP que puede distinguirse de cero es de 18 U/l.

PARAMETROS PARA ANALIZADORES AUTOMATICOS

Para las instrucciones de programación consulte el manual del usuario del analizador en uso.

PRESENTACION

Equipo para 100 ml conteniendo:

- 4 x 20 ml Reactivo A
 - 1 x 20 ml Reactivo B
- (Cód. 1361402)

Equipo para 125 ml conteniendo:

- 5 x 20 ml Reactivo A
 - 2 x 12,5 ml Reactivo B
- (Cód. 1009301)

Equipo para 100 ml conteniendo:

- 4 x 20 ml Reactivo A
 - 1 x 20 ml Reactivo B
- (Cód. 1009241)

Equipo para 100 ml conteniendo:

- 4 x 20 ml Reactivo A
 - 2 x 10 ml Reactivo B
- (Cód. 1009809)

Equipo para 200 ml conteniendo:

- 4 x 40 ml Reactivo A
 - 1 x 40 ml Reactivo B
- (Cód. 1361403)

Equipo para 200 ml conteniendo:

- 8 x 20 ml Reactivo A
 - 2 x 20 ml Reactivo B
- (Cód. 1009602)

BIBLIOGRAFIA

- Bessey, O.A. ; Lowry, O.H. y Brock, M. . - J. Biol. Chem. 164, 231 (1946).
- Bowers, G.N. Jr. and Mc Comb, R.B. - Clin. Chem. 12:70 (1966).
- Mc Comb, R.B.; Bowers, G.N. Jr - Clin. Chem. 18/2:97 (1972).
- D.G.K.C. - Z. Clin. Chem. u. Klin. Biochem. 8: 658 (1970); 9: 464 (1971); 10: 182 (1972).
- S.S.C.C. - Scand. J. Clin. Lab. Invest. 33/4:291 (1974).
- I.F.C.C. - Clin. Chem. 22/3: 384 (1976).
- International Union of Biochemistry Nomenclature Committee - Clin. Chim. Acta 96/1-2: 157 (1979).
- Young, D.S. - Clin. Chem. 21/5: 246 D (1975).
- I.F.C.C. - Clin. Chim. Acta 87/3: 459F (1978).
- Demaria, I.; Setta, F.; Lorenzo, L. - Rev. Asoc. Bioq. Arg. 54/3 (1990).
- Schlebusch, H.; Rick, W.; Lang, H. and Knedel, M. - Dtsch. Med. Wschr. 99:765 (1974).
- Rick, W. - Klinische Chemie und Mikroskopie, p.294, 6th ed., Springer Verlag, Berlin (1990).
- NCCLS document "Evaluation of Precision Performance of

Clinical Chemistry Devices", EP5-A (1999).

- NCCLS document "Evaluation of Linearity of Quantitative Analytical Methods", EP5-A (1986).

- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACCPress, 4th ed., 2001.

Símbolos

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 / Cáustico



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°: 4386/01



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina

UR170131