



ALP 405

cinética optimizada

Para la determinación de fosfatasa alcalina. DGKC y SSCC

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 9,8. La velocidad de aparición del anión p-nitrofenolato (amarillo) a 405 nm, es proporcional a la actividad enzimática de la muestra. La dietanolamina (DEA), regula el pH de la reacción y actúa como aceptor del fosfato liberado por la fosfatasa (transfosforilación), observándose como resultado una activación de la reacción. La DEA reúne las mejores condiciones en cuanto a activación y capacidad tamponante cuando se emplea p-NFF como sustrato; por tal razón, la DGKC y la SSCC la han seleccionado para el desarrollo de sus métodos optimizados.

REACTIVOS PROVISTOS

A. Reactivo A: comprimidos para determinaciones individuales, conteniendo cada uno p-NFF suficiente para determinar una concentración final de 10 mmol/l.

B. Reactivo B: solución de dietanolamina 1 mol/l, pH 9,8 (a 25°C), conteniendo sales de magnesio 0,5 mmol/l.

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Reactivo A: disolver un comprimido de Reactivo A con 2,5 ml de Reactivo B. Agitar hasta disolución completa.

Reactivo B: listo para usar. Tapar inmediatamente después de usar.

INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Cuando el espectrofotómetro ha sido llevado a cero con agua destilada, lecturas de absorbancia del Reactivo A reconstituido mayores a 0,700 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.

Reactivo A reconstituido: estable una semana en refrigerador (2-10°C), a partir del momento de su reconstitución.

MUESTRA

Suero

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

b) Aditivos: no se requieren.

c) Sustancias interferentes conocidas:

- Hemólisis visibles o intensas pueden ser causa de ligeras variaciones en los resultados.

- Los anticoagulantes comunes (tales como EDTA disódico, oxalato, citrato o fluoruro) producen entre 50 y 90% de inhibición de la actividad de fosfatasa alcalina.

- Existen algunas drogas que pueden alterar los niveles séricos de fosfatasa alcalina, por lo que es conveniente interrogar al paciente sobre toda medicación que esté recibiendo.

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 ser congelada (-20°C).

Si el suero es mantenido a temperatura ambiente o en re-

frigorador (2-10°C) se observan aumentos de actividad de fosfatasa alcalina del 5 al 30% en 24 horas.

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. Seleccionar la temperatura de acuerdo al instrumental.
- Tiempo de reacción: 3 minutos
- Volumen de muestra: 20 ul
- Volumen de Reactivo A (Sustrato): 2,5 ml
- Volumen final de reacción: 2,52 ml

Los volúmenes de muestra y de Reactivo A pueden variarse proporcionalmente, manteniendo la relación 1:125.

PROCEDIMIENTO

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

Reactivo A reconstituido	2,5 ml
---------------------------------	--------

Preincubar unos minutos. Luego agregar:

Muestra	20 ul
----------------	-------

Mezclar inmediatamente. Leer la absorbancia inicial y disparar simultáneamente el cronómetro. 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) $\times 0,017 =$ ALP (ukat/l)

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.

PERFORMANCE

a) Reproducibilidad: procesando replicados de las mismas muestras en un mismo día, se obtuvieron los siguientes datos:

Nivel	D.S.	C.V.
296 U/l	$\pm 9,15$ U/l	3,1 %
923 U/l	$\pm 14,6$ U/l	1,6 %

b) Linealidad: la reacción es lineal hasta 1.360 U/l. Para 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: depende del fotómetro empleado. De acuerdo con la sensibilidad requerida, en espectrofotómetro a 405 nm (con cubetas de caras paralelas de 1 cm de espesor, reproducibilidad ± 2 nm, luz espuria $\leq 0,5$ %, semiancho de banda ≤ 8 nm) para un $\Delta A/\text{min}$ de 0,001 el mínimo cambio de actividad detectable será de 7 U/l.

PRESENTACION















- 50 determinaciones (50 \times 2,5 ml) (Cód. 1361401).


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. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AAC Press, 4th ed., 2001.
- I.F.C.C. - Clin. Chim. Acta 87/3: 459F (1978).
- Demaría, I.; Setta, F.; Lorenzo, L. - Rev. Asoc. Bioq. Arg. 54/3 (1990).

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"		Elaborado por:
	Representante autorizado en la Comunidad Europea		Nocivo
	Uso diagnóstico "in vitro"		Corrosivo / Caústico
	Contenido suficiente para <n> ensayos		Irritante
	Fecha de caducidad		Consultar instrucciones de uso
	Límite de temperatura (conservar a)		Calibrador
	No congelar		Control
	Riesgo biológico		Control Positivo
	Volumen después de la reconstitución		Control Negativo
	Contenido		Número de catálogo
	Número de lote		

 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.
Disp. N°: 54/82 - 5671/99

 **Wiener lab.**

2000 Rosario - Argentina