



## FOSFATASA ALCALINA

Números de catálogo: 316-06  
316-20

Presentaciones: 10 x 6.5 mL  
12 x 20 mL

### USO

Para la determinación cuantitativa *in vitro* de fosfatasa alcalina (FA) en suero.

### PRECAUCIONES

No pipetee los reactivos con la boca y evite el contacto con la piel y ojos.

### REACTIVOS

Reactivo de Fosfatasa Alcalina: una solución que contiene (después de reconstituída) un amortiguador (pH 10.24 a 30°C), 3.0 mmol/L de acetato de magnesio, 16 mmol/L de p-NPP di-tris, tensoactivos, estabilizadores y conservadores.

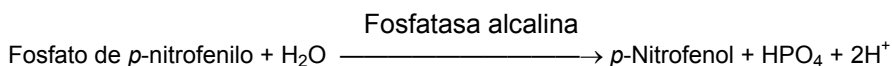
### ANTECEDENTES

El aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina (FA) en suero es importante en el diagnóstico de algunas enfermedades, incluyendo trastornos hepatobiliares así como enfermedades óseas asociadas con incrementos en la actividad osteoblástica. La actividad de la fosfatasa alcalina en suero puede elevarse debido a ictericia obstructiva, oclusión del ducto común de la bilis y el hígado, y cirrosis. (1)

La actividad de la fosfatasa alcalina (FA) fue medida por primera vez por KAY (2). Desde entonces, se han utilizado algunos otros sustratos como el glicerol fosfato y el fenilfosfato. Bessey, Lowry y Brock (3) introdujeron un sustrato más sensible el fosfato de *p*-nitrofenilo (p-NPP). McComb y Bowers (4) estudiaron las condiciones óptimas del amortiguador para medir la actividad de la FA en suero humano. La Sociedad Alemana de Química Clínica hizo recomendaciones de las condiciones óptimas para la determinación de la FA en suero. (5) El comité de enzimas de la sociedad Escandinava de Química Clínica (6) también hizo recomendaciones concernientes a la optimización de las concentraciones para la determinación de la FA en suero. Bowers y McComb publicaron un método selectivo para la medición de la FA total en suero (7). Este procedimiento está basado en las recomendaciones de Bowers & McComb.

### PRINCIPIO

La fosfatasa alcalina hidroliza el *p*-NPP para formar el cromógeno amarillo *p*-nitrofenol de acuerdo con la siguiente ecuación.



El incremento en la absorbancia de la mezcla de reacción a 405 nm debido a la formación del *p*-nitrofenol, es proporcional a la actividad de la fosfatasa alcalina.

### PREPARACION DEL REACTIVO

Prepare el reactivo añadiendo la cantidad de agua desionizada indicada en la etiqueta del vial. Deje reposar por 5 minutos para la reconstitución y enseguida mezcle suavemente.

### ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

Todos los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta a 2-8°C. El reactivo reconstituido es estable por 4 semanas a 2-8°C o 2 días a 18-26°C.

## DETERIORO DEL REACTIVO

La solución del reactivo debe ser clara. La turbidez indicaría deterioro. La absorbancia inicial del reactivo leída contra agua desionizada a 405 nm no deberá exceder de 0.800.

## INSTRUMENTOS

Este reactivo fue optimizado para usarse en instrumentos automatizados con uso manual opcional.

Puede usarse cualquier analizador con control de temperatura de  $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  que sea capaz de leer la absorbancia con exactitud y una sensibilidad de 0.001 a 405 nm. El ancho de banda debe ser de 10 nm ó menos, la desviación de la luz de 0.5% ó menos y la exactitud de longitud de onda dentro de 2 nm.

## RECOLECCION Y PREPARACION DE LA MUESTRA

La muestra de elección debe ser suero fresco, claro y no hemolizado. El EDTA, oxalato y citrato inhiben la acción de la fosfatasa alcalina por lo que debe evitarse su empleo. Las muestras para análisis deben almacenarse a  $2-8^{\circ}\text{C}$ .

## SUBSTANCIAS DE INTERFERENCIA

Este procedimiento mide la fosfatasa alcalina total. Se puede encontrar un resumen de la influencia de drogas en pruebas de laboratorios clínicos consultando el Young, D.S. (8).

## PROCEDIMIENTO

### Materiales proporcionados

Se proporciona el reactivo necesario para la determinación de fosfatasa alcalina.

### Materiales requeridos

1. Un espectrofotómetro que lea absorbancias a 405 nm.
2. Cubetas de 1 cm de paso de luz.
3. Tubos de ensayo para 3.0 mL.
4. Pipetas de 2.5 mL y 25  $\mu\text{L}$ .
5. Agua desionizada y un cronómetro.
6. Un baño maría que se pueda ajustar a 30 ó  $37^{\circ}\text{C}$ .

## CONDICIONES

Longitud de onda .....	405 nm
Temperatura .....	$30^{\circ}\text{C}$ ó $37^{\circ}\text{C}$
Paso de luz .....	1 cm
Tipo de reacción .....	Cinética
Tiempo de reacción .....	4-10 minutos
Volumen de muestra .....	25 $\mu\text{L}$
Volumen de reactivo .....	2.5 mL
Volumen total .....	2.525 mL
Relación muestra/reactivo .....	1/100

## PROCEDIMIENTO

1. Prepare el volumen de reactivo de fosfatasa alcalina requerido.
2. En tubos de ensayo por separado pipetee 25  $\mu\text{L}$  del suero que se va a analizar.
3. Agregue 2.5 mL del reactivo, mezcle e incube de uno a tres minutos a  $30^{\circ}\text{C}$  o  $37^{\circ}\text{C}$ . El tiempo de reacción disminuirá si el reactivo es precalentado a la temperatura de incubación.
4. Registre la absorbancia a intervalos de un minuto hasta que el cambio de absorbancia sea constante.

## CALIBRACION

No se requiere de un estándar para calibrar el procedimiento de fosfatasa alcalina. Los resultados se calculan usando la fórmula dada.

## CONTROL DE CALIDAD

Se debe analizar un suero control de nivel normal y otro de nivel anormal con cada corrida de muestras y los resultados deberán caer dentro de  $\pm 2$  desviaciones estándar del valor establecido. Se obtendrán mejores resultados si se efectúa el análisis de fosfatasa alcalina al mismo tiempo después de la reconstitución diaria del suero control (9,10).

## CALCULOS Y RESULTADOS

### Resultados

La actividad de la fosfatasa alcalina es expresada en unidades/litro (U/L).

### Cálculos

$$\begin{aligned} \text{Fosfatasa Alcalina U/L} &= \frac{\Delta A/\text{min.} \times \text{Volumen del ensayo (mL)} \times 1000}{18.8 \times \text{Paso de luz (cm)} \times \text{Vol. de muestra (mL)}} \\ &= \Delta A/\text{min.} \times 5372 \end{aligned}$$

$\Delta A/\text{min.}$	= Cambio de absorbancia por minuto
Volumen del ensayo	= Volumen total de la reacción en mL
1000	= Conversión de U/mL a U/L
18.8	= Coeficiente de absorbancia del p-nitrofenol a 405 nm
Paso de luz	= Longitud del paso de luz en cm
Volumen de muestra	= Volumen de la muestra en mL
5372	= Factor derivado de las constantes en la ecuación

Ejemplo:

$$\begin{aligned} \text{Fosfatasa Alcalina U/L} &= \frac{0.013 \times 2.525 \times 1000}{18.8 \times 1 \times 0.025} \\ &= 0.013 \times 5372 \\ &= 70 \text{ U/L} \end{aligned}$$

0.013	= Cambio de absorbancia por minuto
2.525	= Volumen total de la reacción en mL
1000	= Conversión U/mL a U/L
18.8	= Coeficiente de absorbancia del p-nitrofenol a 405 nm
1	= Longitud del paso de luz en cm
0.025	= Volumen de la muestra en mL
5372	= Factor derivado de las constantes en la ecuación

### LIMITACIONES

Una muestra con una actividad de fosfatasa alcalina que exceda el límite de linealidad deberá diluirse con solución salina a 0.9% y reanalizarse incorporando el factor de dilución en el cálculo del resultado.

### VALORES ESPERADOS

Menos de 103 U/L (30°C)

Menos de 138 U/L (37°C)

Estos valores son sugeridos. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales para el área donde esté localizado.

## CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Estas características de rendimiento del método fueron generadas en los laboratorios DCL con procedimientos automatizados. Se siguió el protocolo de NCCLS.

### Rango lineal

El procedimiento manual es lineal hasta 1000 U/L de fosfatasa alcalina (Cobas Mira). La linealidad usando procedimientos automatizados depende de la relación muestra/reactivo utilizada.

### Límite inferior de detección

El Límite inferior de detección para el reactivo de fosfatasa alcalina es de 6.0 U/L.

### Estudios de precisión

La precisión de un día a otro se estableció analizando 2 sueros control, 2 veces al día por 20 días.

Fosfatasa Alcalina	N	Media U/L	Desviación Estándar U/L	Coefficiente de Variación %
Suero 1	40	31	2.1	6.8
Suero 2	40	241	4.6	1.9

La precisión dentro de la corrida se estableció analizando dos sueros control, 20 veces.

Fosfatasa Alcalina	N	Media U/L	Desviación Estándar U/L	Coefficiente de Variación %
Suero 1	20	30	1.2	4.0
Suero 2	20	234	2.4	1.0

## EXACTITUD

Se realizó una comparación entre este método y otro similar para fosfatasa alcalina usando 40 muestras en el rango de 15 U/L a 590 U/L. El coeficiente de correlación fue de 0.9993. El análisis de regresión lineal dio la siguiente ecuación:

$$\text{Este método} = 0.87 (\text{método de referencia}) - 0.02 \text{ U/L.}$$

## REFERENCIAS

1. Tietz, N. (Ed.), Fundamentals of Clinical Chemistry, W.B. Saunders Co., Philadelphia, 603-604 (1982).
2. Kay, H.D., Plasma Phosphatase, 1:Method Determination, J.Biol. Chem. 89, 235 (1930).
3. Bessey, O.A., Lowry, S.H., Brock, M.H., A Method for the Rapid Determination of Alkaline Phosphatase with Five Cubic Milliliters of Serum, J. Biol. Chem. 164, 321 (1946).
4. McComb, R.B., Bowers, G.N., Study of Optimum Buffer Conditions for Measuring Alkaline Phosphatase Activity in Human Serum, Clin. Chem. 18, 97 (1972).
5. Recommendations of the German Society of Clinical Chemistry, Standardization of Methods for the Estimation of Enzyme Activity in Biological Fluids, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 8, 182-192 (1972).
6. The Committee on Enzymes of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology: Four Enzymes in Blood, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 33, 291-306 (1974).
7. Bowers, G.N. McComb, R.B., Measurement of Total Alkaline Phosphatase in Human Serum, Clin. Chem. 21, 1988-1995 (1975).
8. Young, D.S., Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, AACCC Press, Third Edition, Washington, 1990.
9. Szasz, G., Increase of Alkaline Phosphatase Activity in Commercial Reference Sera After Reconstitution, Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 126, 29, 12.7 (1972) Abstract.
10. Massion, C.G., Frankenfeld, J.K., Alkaline Phosphatase Lability in Fresh and Frozen Human Serum and in Lyophilized Control Material, Clin. Chem. 18, 366 (1972).
11. Pesce, A.J., Kaplan, L. A., Methods In Clinical Chemistry, Toronto, C.V. Mosby Co., 1078 (1987).

IN31606S-5

Mayo 5, 2003