

# FOSFATASA ALCALINA (ALP)

## Uso:

Para la determinación cuantitativa de la fosfatasa alcalina en el suero humano.

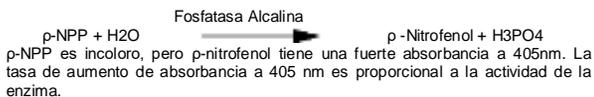
## Introducción:

Distribuido en casi todos los tejidos del cuerpo, los niveles de Fosfatasa Alcalina (ALP) en suero son de interés en el diagnóstico de trastorno hepatobiliar y enfermedad ósea. 1 La mayor parte del ALP en el suero normal para adultos es del hígado o del tracto biliar. 2 Los niveles normales de fosfatasa alcalina dependen de la edad, y son elevados durante períodos de crecimiento óseo activo. Elevaciones moderadas de ALP (que no implican hígado o hueso) pueden ser atribuidas a la enfermedad de Hodgkin, insuficiencia cardíaca congestiva, e infecciones abdominales bacterianas. 3 Elevaciones también se producen en el tercer trimestre del embarazo.

La fosfatasa alcalina se determina midiendo la velocidad de hidrólisis de los ésteres de fosfato diferentes. p-Nitrofenil fosfato es un éster de fosfato tal y se introdujo como un sustrato por Fujita en 1939. 4 Bowers y McComb vuelven a modificar el procedimiento para un ensayo cinético. 5 En 1974, el Comité de Enzimas de la Sociedad Escandinava de Química Clínica y Psicología Clínica adoptaron una modificación del procedimiento anterior como el procedimiento recomendado. 6 El presente método es una modificación de los métodos de referencia de dicho Comité y la Asociación Americana de Química Clínica. 7

## Principio:

La secuencia enzimática empleada en el análisis de Fosfatasa Alcalina es como sigue:



## Composición del Reactivo:

Después de combinar R1 y R2 como se indica, el reactivo contiene:

1. p-Nitrofenil Fosfato 17 mM
2. Iones de Magnesio 4 mM
3. Buffer (pH 10.2 ± 0.2)
4. Activador y aglomerante

## Advertencias y Precauciones:

1. Para el uso de diagnóstico in vitro.

**PRECAUCIÓN:** Los reactivos de diagnóstico in vitro pueden ser peligrosos. Manipular siguiendo los procedimientos de laboratorio que determinan evitar la ingestión y el contacto con los ojos o la piel.

2. Las muestras deben ser considerados infecciosas y manejadas apropiadamente.

## Preparación del Reactivo:

El reactivo de trabajo se prepara mezclando 5 partes de reactivo R1 con 1 parte de reactivo R2 en un recipiente desechable.

## Almacenaje y Estabilidad:

Almacenar el reactivo a 2-8°C. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad si se almacena según las indicaciones. El reactivo de trabajo es estable durante 14 días a 2-8°C. Proteger de la luz directa. Evite la contaminación microbiana.

## Deterioro del Reactivo:

El reactivo debe ser desechado si:

1. Se ha producido Turbidez: la turbidez puede ser un signo de contaminación.
2. El reactivo de trabajo tiene una absorbancia contra agua mayor que 0.8 a 405 nm.

## Recolección de la Muestra:

Suero no hemolizado es la muestra preferida. Plasma heparinizado puede también ser utilizado. Oxalato, fluoruro y EDTA inhiben la fosfatasa alcalina, así que no son adecuados como anticoagulantes. 8 Las muestras deben mantenerse frías y ser analizadas tan pronto como sea posible después de la recogida. Una rutina programada para la toma de muestras y el análisis debe establecerse en cada laboratorio ya que los niveles de fosfatasa alcalina en suero o plasma o en el suero de control reconstituido, se elevan considerablemente cuando se almacenan a 2-8°C o a temperatura ambiente.

## Substancias que Interfieren:

EDTA, citrato, fluoruro y oxalato inhiben la fosfatasa alcalina. Young et al. da una lista de medicamentos y otras sustancias que pueden interferir con la determinación de la actividad de ALP. 9

## Materiales Necesarios pero no Provistos:

1. Dispositivos de pipeteo.
2. Tubos de ensayo/estante.
3. Cronómetro.
4. Espectrofotómetro con cubeta de temperatura controlada.

5. Baño calentamiento/bloqueo.

## Instrucciones Generales:

El reactivo para Fosfatasa Alcalina (ALP) se utiliza como un procedimiento automatizado en instrumentos de química o como un procedimiento manual en un espectrofotómetro adecuado.

## Procedimiento Automatizado:

Consulte el manual de aplicación apropiado disponible.

## Procedimiento (Manual):

1. Prepare el reactivo de trabajo de acuerdo con las instrucciones.
2. Pipetear 1.0 mL de reactivo en los tubos apropiados y permitir que se equilibren a 37°C.
3. Cero el espectrofotómetro con agua a 405 nm.
4. Transfiera 0.025 mL (25 µL) de muestra al reactivo. Mezclar bien.
5. Después de un (1) minuto, medir la absorbancia. Volver el tubo a 37°C. Repita las lecturas cada minuto durante los próximos dos (2) minutos.\*
6. Calcule la diferencia de absorción por minuto. (Δ Abs./min.)
7. El Δ Abs. /min. multiplicado por el factor de 2187 (véase el cálculo) obtendrá resultados en IU/L.
8. Las muestras con valores por encima de 800 IU/L se deben diluir con un volumen igual de solución salina, re-analizadas y los resultados multiplicados por dos (2).

**\*Nota:** Si el espectrofotómetro utilizado está equipado con una cubeta térmica, la mezcla de reacción puede dejarse en la cubeta mientras se toman las lecturas de absorbancia.

## Volúmenes Alternativos:

Si el espectrofotómetro puede leer con precisión el volumen final de 0.50 ml o menor; siga el "Procedimiento alternativo"

Unidad: Una unidad es la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micromol de sustrato por minuto bajo condiciones especificadas.

$$\text{IU/L} = \frac{\Delta \text{ Abs. /min.} \times 1000 \times \text{TV}}{\epsilon \times \text{LP} \times \text{SV}} = \frac{\Delta \text{ Abs. /min.} \times 1000 \times 1.025}{18.75 \times 1 \times 0.025} = \Delta \text{ Abs. /min.} \times 2187$$

Donde:

Δ Abs./min. = Cambio en Absorbancia  
1000 = Conversión de IU/ml a IU/L  
TV = Volúmen de reacción total (1.025 mL)  
ε = Absorción milimolar de p-nitrofenol 18.75  
LP = Paso de luz en centímetros (1.0 cm)  
SV = Volúmen de muestra (0.025 mL)

Ejemplo: Si el Δ Abs. /min. = 0.007 entonces 0.007 x 2187 = 15.3 IU/L.

**Nota:** Si los parámetros de ensayo se modifican el factor tiene que volverse a calcular utilizando la fórmula anterior.  
Unidades SI: Para convertir a unidades SI (nkat/L) multiplicar IU/L por 16.67.

## Procedimiento Alternativo:

1. Prepare el reactivo de trabajo de acuerdo con las instrucciones.
2. Pipetear 0.50 mL (500 µL) de reactivo en los tubos apropiados y permitir que se equilibren a 37°C.
3. Cero el espectrofotómetro con agua a 405 nm.
4. Añadir 0.010 mL (10 µL) de muestra al reactivo, mezcle bien.
5. Después de un (1) minuto, medir la absorbancia. Volver los tubos a 37°C. Repita las lecturas cada minuto durante los próximos dos (2) minutos.\*
6. Calcular la diferencia de absorción por minuto (Δ Abs./Min.).
7. El Δ Abs. /Min. multiplicado por el factor 2187 (ver Cálculos) obtendrá resultados en IU/L.
8. Las muestras con valores por encima de 800 IU/L se deben diluir 1:1 con solución salina, re-analizadas y los resultados multiplicados por dos (2).

**\*Nota:** Si el espectrofotómetro utilizado está equipado con una cubeta térmica, la mezcla de reacción puede dejarse en la cubeta mientras las lecturas de absorbancia se toman.

## Cálculos:

Unidad: Una unidad es la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micromol de sustrato por minuto bajo condiciones especificadas.

$$\frac{\Delta \text{ Abs. /Min.} \times 1000 \times 0.510}{18.75 \times 1 \times 0.010} = \Delta \text{ Abs. /min.} \times 2720$$

Donde:

Δ Abs./Min. = Cambio en Absorbancia  
1000 = Conversión de IU/ml a IU/L  
TV = Volúmen de reacción total (0.510mL)  
1 cm = Paso de luz en centímetros  
18.75 = Absorción milimolar de p-nitrofenol  
SV = Volúmen de muestra (0.010mL)

Ejemplo: A1 = 0.56, A2 = 0.60  
Entonces: (0.60 - 0.56) = 0.04 x 2720 = 108.8 IU/L

**Nota:** Si los parámetros de ensayo se modifican el factor tiene que volverse a calcular utilizando la fórmula anterior.

Unidades SI: Para convertir a unidades SI (nkat/L) multiplicar IU/L por 16.67.

## Limitaciones:

Esta metodología mide fosfatasa alcalina total, independientemente del tejido o del órgano de origen. Los exámenes adicionales pueden ser necesarios para ayudar en el diagnóstico diferencial.

## Control de Calidad:

Se recomienda que los controles se incluyan en cada serie de pruebas. Material de control disponible comercialmente con los valores establecidos de fosfatasa alcalina pueden ser usados para el control de calidad. El valor asignado del material de control debe ser confirmado por la aplicación elegida. Si no se obtiene el rango apropiado de valores puede indicar deterioro del reactivo, mal funcionamiento del instrumento, o errores de procedimiento.

## Valores Esperados:

Adultos: 25-90 IU/L a 37°C. Los niños tienen un valor normal superior. Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio establezca su propio rango normal.

## Características de Rendimiento:

1. Linealidad: 900 IU/L.
2. Comparación: Un grupo de 94 sueros que van en valores de fosfatasa alcalina de 26.5 a 688 IU/L se analizaron por este método y un reactivo similar disponible en el mercado. En la comparación de los resultados se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.997 y la ecuación de regresión fue  $y = 1.290x - 5.89$ . (Estudios de comparación se realizaron de acuerdo con las directrices del NCCLS indicativas, EP9-T.)
3. Estudios de Precisión:

## Dentro de la Corrida:

Promedio (IU/L)	S. D.	C. V. %
46.7	3.9	8.3
157.8	3.3	2.1

## Corrida-a-Corrida:

Promedio (IU/L)	S. D.	C. V. %
44.4	2.8	6.4
157.0	3.1	1.9

## Referencias

1. Kochmar, J.F., and Moss, D.W.: Fundamentals of Clinical Chemistry, N. W. Tietz (ed), p. 604, W. B. Saunders and Company, Philadelphia, PA (1976).
2. Kaplan, M.M., and Righetti, A.: J. Clin. Inv. 34:126 (1955).
3. Kaplan, M.M.: New England J. Med. 286:200 (1972).
4. Fugita, H.: Über die Miorbestimmung der Blutphosphatase. J. Biochem. (Japan) 30:69 (1939).
5. Bowers, G. N., Jr., McComb, R. B.: A Continuous Spectrophotometric Method for Measuring Activity of Serum Alkaline Phosphatase. Clin. Chem. 12:70 (1966).
6. The Committee on Enzymes of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology: Recommended Methods for the Determination of Four enzymes in blood. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 32:29 (1974).
7. Tietz, N.W., (ed) : Study Group on Alkaline Phosphatase. A Reference Method for measurement of alkaline phosphatase activity in Human Serum. Clin. Chem. 29:751 (1983).
8. Demetriou, J.A., et al : Enzymes in Clinical Chemistry Principles and Technics, 2nd Ed. Hagerstown (MD), Haroer and Row 927 (1974).
9. Young, D.S., et al: Clin. Chem 21:5 (1975).
10. Tietz, N.: Fundamentals of Clinical Chemistry 602-609 (1976).

