

**TECO GRAM S.A.**  
Av. San Jorge 428 y 10ma.  
Guayaquil - Ecuador  
042396966 – 042397979 – 042396610  
tecogram@gye.satnet.net

## Juego de Reactivos para Fosfatasa Alcalina (Método Cinético)

### JUEGO DE REACTIVOS PARA FOSFATASA ALCALINA

Para la determinación cuantitativa de fosfatasa alcalina en suero humano.

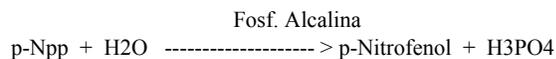
#### INTRODUCCION

Distribuida casi en cada tejido del cuerpo, los niveles de la fosfatasa alcalina (FAL) en suero son de interés en el diagnóstico de desordenes hepatobiliares y enfermedad de los huesos. La mayor parte de FAL en suero normal de un adulto viene del hígado o del tracto biliar. Los niveles normales de la fosfatasa alcalina dependen de la edad, y los niveles son elevados durante períodos de crecimiento activo de los huesos. Aumentos moderados de FAL (indiferente al hígado o huesos) puede ser atribuida a la enfermedad de Hodgkin, congestión de corazón, e infecciones abdominales bacterianas. Los aumentos también ocurren en el tercer trimestre del embarazo.

La Fosfatasa Alcalina se determina midiendo el porcentaje de hidrólisis de varios ester de fosfato. El fosfato p-Nitrofenil es uno de los ester de fosfato que ha sido usado como sustrato por Fujita en 1939. Bowers y McComb más adelante modificaron el procedimiento hacia un ensayo cinético. En 1974, el Comité de Enzimas de la Sociedad Escandinava para Química Clínica y Fisiología clínica recomendó un procedimiento que era una modificación del procedimiento mencionado. El método presente es una modificación de los métodos de referencia del comité mencionado y de la Asociación Americana para Química Clínica.

#### PRINCIPIO

La secuencia enzimática empleada en el ensayo de Fosfatasa Alcalina es la siguiente:



El p-Npp no tiene color pero el p-Nitrofenol tiene una fuerte absorbancia a 405 nm. El porcentaje del aumento en la absorbancia a 405 nm es proporcional a la actividad enzimática.

#### COMPOSICIÓN DEL REACTIVO

Cuando se lo reconstituye como se debe, el reactivo para Fosfatasa Alcalina contiene lo siguiente:  
(Reactivo de Fosfatasa Alcalina): Fosfato de p-Nitrofenil 17 mM, Iones de Magnesio 4 mM, Buffer (pH 10.2 ± 0.2), activador y fusionador.

#### ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Para diagnóstico "In Vitro".  
PRECAUCION: Los reactivos para diagnóstico "In vitro" pueden ser peligrosos.

- Manipúlese de acuerdo a un buen procedimiento de laboratorio que evite la ingestión y el contacto con ojos y piel.
- Las muestras de suero deben considerarse infecciosas y deben manipularse adecuadamente.
- Use el agua destilada o desionizada indicada.

#### ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Almacene el juego de reactivos de 2 – 8°C (refrigerado). El reactivo reconstituido es estable por treinta (30) días cuando se lo ha almacenado a 2 – 8°C y por veinticuatro (24) horas a temperatura ambiente.

- Almacénese el reactivo a temperatura ambiente (18 – 30°C).

#### DETERIORO DEL REACTIVO

El reactivo debe ser desechado si:

- Ha ocurrido turbidez; la turbidez puede ser señal de contaminación.
- Ha penetrado humedad al frasco.
- El reactivo reconstituido tiene una absorbancia contra el agua mayor de 0.8 a 405 nm.

#### RECOLECCION DE LA MUESTRA

Se prefiere como muestra al suero no hemolizado. EL plasma heparinizado también puede ser usado. El Oxalato, fluoruros, y EDTA pueden inhibir la fosfatasa alcalina, por lo tanto no deben ser usados como anticoagulantes. Las muestras deben mantenerse frías y deben ser analizadas lo antes posible después de su recolección. El tiempo de rutina para la recolección de la muestra y para el análisis debe ser establecido por cada laboratorio debido a que los niveles de FAL en el suero o plasma, o en sueros de control reconstituidos, aumentan significativamente cuando se los ha almacenado de 2 – 8°C o a temperatura ambiente.

#### SUSTANCIAS QUE INTERFIEREN

El EDTA, citratos, fluoruros y oxalatos inhiben la fosfatasa alcalina. Young provee una lista de drogas y otras sustancias que interfieren con la determinación de la actividad de FAL.

#### MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

- Pipetas de precisión.
- Tubos de ensayo/ Porta tubos.
- Reloj.
- Espectrofotómetro con una cubeta de temperatura controlada.
- Baño María o bloque térmico.

#### INSTRUCCIONES GENERALES

El reactivo para Fosfatasa Alcalina puede usarse tanto en métodos manuales como automatizados.

#### PROCEDIMIENTO MANUAL

1. Reconstituya el reactivo de acuerdo a las instrucciones.
2. Pipetee 1.0 ml de reactivo en los tubos apropiados y deje equilibrar a 37°C.
3. Ponga el espectrofotómetro a 0 con agua a 405 nm.
4. Transfiera 0.025 ml (25 ul) de muestra al reactivo. Mezcle bien.
5. Después de un (1) minuto, mida la absorbancia. Devuelva el tubo a la temperatura de 37°C. Repita las lecturas cada minuto por los siguientes dos (2) minutos.\*
6. Calcule diferencia promedio de absorbancia por minuto.
7. El  $\Delta$  Abs./min multiplicado por el factor 2187 (Vea Cálculos) lo llevará a los resultados en IU/L.
8. Las muestras con valores por encima de 800 IU/L deben ser diluidas en 1:1 con solución salina, deben ser re-analizadas y los resultados deben ser multiplicados por dos (2).

**Nota:** Si el espectrofotómetro a usarse está equipado con una cubeta de temperatura controlada, la mezcla de la reacción puede ser dejada en la cubeta mientras se toman las lecturas de las absorbancias.

### VOLUMENES

Si el espectrofotómetro a usarse puede leer con precisión el volumen final de 0.50 ml o volúmenes menores, siga el "PROCEDIMIENTO ALTERNATIVO"

Unidad: Una unidad es la cantidad de enzima que cataliza la transformación de una micromol de sustrato por minuto bajo las 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:

- $\Delta$  Abs./min = Cambio de absorbancia por minuto
  - 1000 = Conversión de IU/ml a IU/L.
  - TV = Volumen de la reacción total (1.025 ml.)
  - $\epsilon$  = Absorción mili molar de p-Nitrofenol (18.75)
  - LP = Paso de la luz en centímetros (1.0 cm)
  - SV = Volumen de la muestra (0.01 ml.)
- Ejemplo: Si el  $\Delta$  Abs./min. = 0.007 entonces  $0.007 \times 15.3$  IU/L.

NOTA: Si los parámetros de la prueba son alterados el factor debe ser recalculado usando la fórmula descrita.

UNIDADES SI: Para convertir a unidades SI (nkat/L) multiplique IU/L por 16.67.

### PROCEDIMIENTO ALTERNATIVO

1. Reconstituya el reactivo de acuerdo a las instrucciones.
2. Pipetee 0.50 ml (500  $\mu$ L) de reactivo en tubos apropiados y deje equilibrar a 37°C.
3. Ponga a cero el espectrofotómetro con agua a 450 nm.
4. Añada 0.010 ml (10  $\mu$ L) de la muestra al reactivo, mezcle bien.
5. Después de un (1) minuto, mida la absorbancia. Devuelva el tubo a los 37°C. Repita las lecturas cada minuto por los siguientes dos (2) minutos.
6. Calcule a diferencia promedio de las absorbancias por minuto ( $\Delta$  Abs./min.).

7. Multiplique el  $\Delta$  Abs./min por el factor 2720.
8. Las muestras con valores por encima de 800 IU/L deben ser diluidas a 1:1 con solución salina, re-analizadas y el resultado debe ser multiplicado por dos (2).

### CALCULOS DEL PROCEDIMIENTO

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

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

Donde:

- $\Delta$  Abs./min = Cambio de absorbancia por minuto
- 1000 = Conversión de IU/ml a IU/L.
- TV = Volumen de la reacción total (0.510 ml.)
- 1 cm = Paso de la luz en centímetros.
- 18.75 = Absorción mili molar del p-Nitrofenol.
- SV = Volumen de la muestra (0.025 ml.)

Ejemplo: A1 = 0.56, A2 = 0.60

$$\text{Entonces: } (0.60 - 0.56) = 0.04 \times 2720 = 108.8 \text{ IU/L}$$

NOTA: Si los parámetros de la prueba son alterados, el factor debe ser re calculado usando la fórmula descrita.

UNIDADES SI: Para convertir a unidades SI (nkat/L) multiplique IU/L por 16.67.

### LIMITES DEL PROCEDIMIENTO

Esta metodología mide la Fosfatasa Alcalina total ya sea de origen del tejido u orgánico. Se deben realizar otras pruebas que ayuden a una diferenciación en el diagnóstico.

### CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda incluir controles en cada juego de ensayos. Pueden ser usados el material de controles disponibles en el mercado con valores establecidos de Fosfatasa Alcalina. El volumen asignado del material de control debe ser con/L, por la aplicación escogida. Un fracaso al obtener un rango apropiado de valores en el ensayo del material de control puede indicar ya sea deterioro del reactivo, mal funcionamiento del instrumento, o errores del procedimiento.

### VALORES ESPERADOS

Adultos 25 – 90 IU/L a 37°C. Los niños tienen un valor normal más alto. Se recomienda mucho que cada laboratorio establezca su propio rango normal.

### CARACTERISTICAS DE LA PRUEBA

1. Linearidad: 900 IU/L.
2. Comparación: De un estudio realizado entre el procedimiento presente y un producto comercial resultó una correlación de coeficiente de 0.99 con una regresión de  $y = 0.95x + 3.50$ .
3. Estudios de precisión.

Promedio IU/L	Dentro de la corrida	
	S.D.	C.V.
76.1	2.1	2.7%
331.3	15.4	4.6%

**De corrida a corrida**

<u>Promedio IU/L</u>	<u>S.D.</u>	<u>C.V.</u>
75.3	5.1	6.7%
328.6	11.26	3.4%