



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 Color (Punto final)

JUEGO DE REACTIVOS PARA FOSFATASA ALCALINA.

Para determinación Colorimétrica de la fosfatasa alcalina en suero.

INTRODUCCIÓN

Al encontrarse distribuida en casi todos los tejidos corporales, los niveles de fosfatasa alcalina en suero son de interés diagnóstico en los desórdenes hepatobiliares y en enfermedades óseas. La mayor parte de la fosfatasa alcalina en el suero de adultos normales proviene del hígado y del tracto biliar. Los niveles normales de fosfatasa alcalina dependen de la edad y se elevan durante el periodo de crecimiento óseo. Aumentos moderados de la fosfatasa (no incluido el hígado y sistema óseo), pueden distribuirse a la enfermedad de Hodgkin, a fallo cardíaco congestivo y a infecciones bacterianas abdominales.

Los primeros métodos se basaban en la medición de la fosfatasa liberada por la acción de la enzima sobre un sustrato de Betagliberofosfato o en la medición del fenol liberado de un sustrato de Fenil-fosfato. Muchos de estos sustratos eran inestables en solución y necesitaban ser preparados frescos en el día. El sustrato desarrollado por Roy, el cual utiliza Sodiolumfaleína monofosfatada es estable por un año cuando se almacena adecuadamente.

PRINCIPIOS

La fosfatasa alcalina actúa sobre una solución de AMP-tamponada de timolfaleína monofosfarada. La adición de un reactivo alcalino detiene la actividad enzimática y desarrolla simultáneamente un cromógeno azul que se mide fotocolorimétricamente.

COMPOSICIÓN DEL REACTIVO.

Sustrato de fosfatasa alcalina: 3.6 nM de timolfaleína monofosfatada en 0.2M, 2-Amina-2Metil-1-Propanol como buffer. Cloruro de magnesio 1.0 mM. agente humectante, ingredientes inactivos y preservativos a pH 10.2.

Precaución: Puede causar irritación de la piel.

Revelador para fosfatasa alcalina: 0.1 de carbonato de sodio. **Peligro: Causa quemaduras.**

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Este reactivo es para diagnóstico in Vitro solamente.
2. Las muestras deben considerarse infecciosas y deben ser manipuladas adecuadamente.
3. En caso de contacto con el revelador para fosfatasa alcalina, lavarse con abundante agua. No se ingiera

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Almacénese el juego de reactivo entre 2 – 8° C. (refrigerado).

DETERIORO DEL REACTIVO

El Reactivo debe desecharse si:

1. El sustrato de fosfatasa alcalina debe ser de un color ámbar claro. Si se observa precipitado o un color verde-azul hay deterioro.
2. El revelador de fosfatasa alcalina debe ser una solución clara y transparente.
3. Cambian de valores en el patrón de fosfatasa alcalina al valorar sueros controles frescos pueden indicar deterioro.

RECOLECCION DE LAS MUESTRAS

La muestra idónea es el suero no hemolizado. También puede usarse plasma heparinizado. El oxalato, los fluoruros y el EDTA Inhiben la fosfatasa alcalina, por tanto no deben mantenerse en refrigeración y analizadas lo antes posible después de su recolección. Se debe establecer una rutina en cuanto a tiempo pues las muestras para fosfatasa alcalina tanto en suero como en plasma o en el suero control reconstituidos, aumentan de valor significativamente cuando se almacenan entre 2 y 8° C. o a temperatura ambiente.

SUSTANCIAS QUE INTERFIEREN

El EDTA, citratos, fluoruros y oxalatos inhiben la fosfatasa alcalina. Young y sus colaboradores ofrecen una lista de drogas y sustancias que pueden interferir en la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina.

MATERIALES REQUERIDOS Y NO PROVISTOS

1. Pipetas de precisión con volúmenes adecuados.
2. Reloj.
3. Tubos de ensayo y porta tubos.
4. Incubador a 37° C.
5. Espectrofotometro.

PROCEDIMIENTO (MANUAL)

1. Para cada muestra, dispense 0.5ml de sustrato de fosfatasa alcalina en tubos rotulados e incúbase a 37° C. durante tres minutos.
2. Agregue 0.05ml (50ul) de estándar, control y muestras a los tubos respectivos.
3. Incúbase exactamente 10 minutos a 37° C.
4. Agregue 2.5ml. de reactivo de color para fosfatasa alcalina a cada tubo. Mezcle bien.
5. Utilizando rango de 590nm ajuste el espectrofotometro a cero con blanco de reactivo.
6. Anote las absorbancias obtenidas.

Nota: si la actividad es mayor de 100 UI/L repita el examen diluyendo la muestra a partes iguales con solución salina y multiplique los resultados obtenidos por dos. El color final es estable por 60 minutos a temperatura controlada entre 15 y 30° C.

CALCULOS

Abs = Absorbancia

Abs de la Muestra x Valor de Estándar = Valor en UI/L
Abs del Estándar

Ejemplo:

$$0.224 \times 50 \text{ UI/L} = 35.7 \text{ UI/L}$$
$$0.313$$

LIMITES DEL PROCEDIMIENTO

Este método mide concentraciones totales de fosfatasa alcalina independiente del organo o tejido de origen. Pudieran necesitarse otros exámenes para complementar el diagnóstico diferencial.

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda incluir controles en cada corrida de muestra. Puede utilizarse controles comerciales con concentraciones conocidas de fosfatasa alcalina como control de calidad. El valor del control debe confirmarse con este examen. Si se tiene dificultades para obtener el rango adecuado de valores podemos estar en presencia de reactivos deteriorados, mal funcionamiento instrumental o errores de procedimiento.

VALORES ESPERADOS

Adultos entre 9 y 35UI/L a 37°. En niños se obtiene valores normales más evaluados, es muy recomendable que cada laboratorio establezca su propio rango.

CARACTERISTICAS DEL METODO.

- 1 Linealidad: 100 UI/L
- 2 Sensibilidad: basada en una resolución instrumental de $A = 0.001$, el método tiene una sensibilidad de 0.16 UI/L.
- 3 Comparación: un estudio desarrollado entre éste método y otro producto comercial arrojó un

coeficiente a correlación de 0.99 con una regresión de $y = 1.02x + 0.75$.

4 Estudio de la precisión:

<u>Dentro de la corrida</u>			<u>De Corrida a corrida</u>		
<u>Valor</u>	<u>D.S.</u>	<u>C.V.%</u>	<u>Valor</u>	<u>D.S.</u>	<u>C.V.</u>
34.8	1.1	3.1	34.9	1.5	4.2
85.6	2.6	3.1	84.3	2.6	3.1