

IMPORTANCIA CLINICA

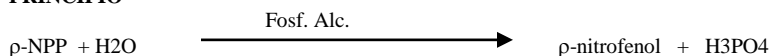
Las estimaciones de fosfatasa alcalina en suero son de interés en el diagnóstico de 2 tipos de condiciones: enfermedades hepatobiliares y enfermedades óseas asociadas con un incremento en la actividad osteoblástica.

RESUMEN

La fosfatasa alcalina en suero se determina midiendo la razón de la hidrólisis de varios ésteres de fosfato bajo condiciones específicas. El ρ -nitrofenil fosfato es uno de estos ésteres de fosfato y fue introducido por Fujita en 1939.

Bessey, Lowry y Brock publicaron un procedimiento de punto final en 1946, mientras que Bowers y McComb reportaron un procedimiento cinético en 1966. el procedimiento cinético ha sufrido varias modificaciones y es recomendado para análisis de rutina. Este reactivo líquido está basado en el método recomendado de la AACC.

PRINCIPIO



ρ -nitrofenil fosfato es hidrolizado a ρ -nitrofenol y fosfato inorgánico. La razón a la cuál el ρ -NPP es hidrolizado se mide a 405 nm, y es directamente proporcional a la actividad de la fosfatasa alcalina.

REACTIVOS

Después de combinar R1 y R2 el reactivo contiene: Buffer AMP pH 10.45; ρ -NPP 16 mM; iones de magnesio 1.0 mM; activadores y preservativos.

El reactivo de trabajo se prepara mezclando 5 partes de R1 y una parte de R2.

Los reactivos se guardan a 2-8-°C. Son estables hasta la fecha de caducidad si guardan a esta temperatura.

El reactivo de trabajo es estable 14 días si se guarda a 2-8 °C y 7 días a temperatura ambiente.

Se deben proteger de la luz solar, y evitar contaminación microbiana.

INTERFERENCIAS

Algunas drogas interfieren en la actividad de fosfatasa alcalina.

Se ha encontrado que bilirrubinas de por lo menos 20 mg/dL o hemoglobinas de por lo menos 100 mg/dL tienen un efecto insignificante en esta prueba.

NOTA: los niveles de fosfatasa alcalina fueron de 91 U/L para el estudio de bilirrubina y de 98 U/L para el estudio de hemoglobina.

MATERIAL

Reactivos R1 Y R2 de ALP

MATERIAL REQUERIDO NO SUMINISTRADO

Pipetas automatizadas

Cronómetro

Tubos de ensayo

Espectrofotómetro con capacidad de leer a 405 nm (UV)

Bloque térmico

Sueros control para fosfatasa alcalina

PROCEDIMIENTO (AUTOMATIZADO GENERAL)

Longitud de onda	405 nm
Tipo de ensayo	cinético
Razón muestra/ reactivo	1:41
Dirección de la reacción	creciente
Temperatura	37°C
Tiempo lag	60 segundos
Tiempo de lectura	60 segundos
Valor normal bajo	35 U/L
Valor normal alto	123 U/L

PROCEDIMIENTO (MANUAL)

1. Prepare el reactivo de acuerdo al instructivo
2. Pipetee 1 mL de reactivo de trabajo en cada tubo.
3. Pre-caliente 5 minutos a 37 °C.
4. Agregue 25 µL de suero a los tubos respectivos y mezcle. Incube todos los tubos a 37 °C por 1 minuto.
5. Después de un minuto lea y anote la absorbancia a 405 nm contra blanco de agua. Vuelva a hacer lecturas a los 60 y 120 segundos.
6. Calcule la diferencia de absorbancias absorbancia / minuto. Esta diferencia se multiplica por el factor 2187 y así se obtiene el resultado en U/L.

CALIBRACIÓN

El procedimiento está estandarizado por la media de la absorbancia de p-nitrofenol tomada como 18.75 a 405 nm bajo las condiciones de prueba descritas. Los resultados están basados en el cambio de absorbancia por unidad de tiempo; todos los parámetros deben ser conocidos y controlados.

LIMITACIONES

Esta metodología mide fosfatasa alcalina total no respectiva del tejido u órgano de origen. es necesario hacer otra prueba para un diagnóstico diferencial.

Muestras con valor arriba de 1000 UI/L deben ser diluidas 1:1 con solución salina, reensayadas, y el resultado se multiplica por 2.

CALCULOS

Una unidad internacional (UI/L) está definida como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micromol de sustrato por minuto bajo condiciones específicas.

$$\text{ALP (UI/L)} = \frac{\Delta \text{ Abs/min} * 1.025 * 1000}{18.75 * 0.025 * 1.0} = \Delta \text{ Abs/min} * 2187$$

donde :

$\Delta \text{ Abs/min}$ = cambio de absorbancia por minuto

1000 = conversión UI/mL a UI/L

1.025 = volumen total de reacción (mL)

18.75 = absorbancia milimolar de p-nitrofenol

0.025 = volumen de muestra (mL)

1.0 = paso de luz en cm

CONTROL DE CALIDAD

Se debe correr rutinariamente sueros control normal y anormal con concentraciones conocidas para monitorear la validez de la reacción. Estos controles se deben correr por lo menos cada vez que se vayan a procesar determinaciones de ALP. Se recomienda que cada laboratorio tenga su propia frecuencia de determinación de control.

VALORES ESPERADOS

Adultos: 35-123 UI/L (37°C)

Este rango de referencia está basado en un estudio realizado en 783 muestras de adultos aparentemente sanos. los niños tienen un valor normal más alto.

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

LINEARIDAD

0-1000 UI/L

FABRICADO POR:

POINTE SCIENTIFIC, INC.
E.E.U.U.