

**Fosfatasa Alcalina.p-Nitrofenilfosfato. Cinético.Líquido.DGKC** Ref.: ALP-001  
 Determinación cuantitativa de fosfatasa alcalina 5x40 / 1x50 mL  
 Solo para uso in vitro en el laboratorio clínico Ref.: ALP-001B  
 Conservar a 2-8°C 1x1000 / 1x250 mL

## FOSFATASA ALCALINA



### PRINCIPIO DEL MÉTODO

La fosfatasa alcalina (FAL) cataliza la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato (pNPP) a pH 10,4 liberando p-nitrofenol y fosfato, según la siguiente reacción:



La velocidad de formación del p-Nitrofenol, determinado fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de fosfatasa alcalina en la muestra ensayada<sup>1,2</sup>.

### SIGNIFICADO CLÍNICO

Las fosfatasas alcalinas son enzimas que se encuentran presentes en casi todos los tejidos del organismo, siendo particularmente alta su presencia en huesos, hígado, placenta, intestinos y riñón.

Tiene importancia clínica tanto su aumento como su disminución de los niveles en plasma.

Causas más probables de aumento del nivel de FAL:

Enfermedad ósea de Paget, obstrucciones hepáticas, hepatitis, hepatotoxicidad por medicamentos y osteomalacia.

Causas más probables de disminución del nivel de FAL:

Cretinismo y déficit de vitamina C<sup>1,5,6</sup>.

El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

### REACTIVOS

|            |                             |            |
|------------|-----------------------------|------------|
| <b>R 1</b> | Dietanolamina (DEA) pH 10,4 | 1 mmol/L   |
| Tampón     | Cloruro de magnesio         | 0,5 mmol/L |
| <b>R 2</b> | p-Nitrofenilfosfato (pNPP)  | 10 mmol/L  |
| Substrato  |                             |            |

### PREPARACIÓN

Reactivo de trabajo (RT):

Mezclar: 1 vol. de (R2) Substrato + 4 vol. (R1) Tampón.

Estabilidad: 1 mes a 2-8°C o 10 días a temperatura ambiente.

### CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial, cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación. No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

#### Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancia del Blanco a 405  $\geq$  1,50.

### MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 405 nm.
- Baño termostatisable a 25°C, 30°C ó 37°C ( $\pm$  0,1°C)
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

### MUESTRAS

Suero o plasma heparinizado<sup>1</sup>. Usar suero libre de hemólisis, separado de los hematíes lo antes posible.

Estabilidad: 3 días a 2-8°C.

### PROCEDIMIENTO

1. Condiciones del ensayo:

Longitud de onda: ..... 405 nm

Cubeta: ..... 1 cm paso de luz

Temperatura constante: ..... 25°C / 30°C / 37°C

2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada o aire.

3. Pipetear en una cubeta:

|                    |     |
|--------------------|-----|
| RT (mL)            | 1,2 |
| Muestra ( $\mu$ L) | 20  |

4. Mezclar, incubar 1 minuto.

5. Leer la absorbancia (A) inicial de la muestra, poner en marcha el cronómetro y leer la absorbancia cada minuto durante 3 minutos.

6. Calcular el promedio del incremento de absorbancia por minuto ( $\Delta A/\text{min}$ ).

### CÁLCULOS

$\Delta A/\text{min} \times 3300 = \text{U/L de FAL}$

**Unidades:** La unidad internacional (UI) es la cantidad de enzima que convierte 1  $\mu$ mol de sustrato por minuto, en condiciones estándar. La concentración se expresa en unidades por litro (U/L).

### Factores de conversión de temperaturas

Los resultados pueden transformarse a otras temperaturas multiplicando por:

| Temperatura de medición | Factor para convertir a |      |      |
|-------------------------|-------------------------|------|------|
|                         | 25°C                    | 30°C | 37°C |
| 25°C                    | 1,00                    | 1,22 | 1,64 |
| 30°C                    | 0,82                    | 1,00 | 1,33 |
| 37°C                    | 0,61                    | 0,75 | 1,00 |

### CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados.

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, se debe revisar el instrumento, los reactivos y la técnica.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

### VALORES DE REFERENCIA<sup>1</sup>

|                   | 25°C         | 30°C         | 37°C         |
|-------------------|--------------|--------------|--------------|
| Niños (1-14 años) | < 400 U/L    | < 480 U/L    | < 645 U/L    |
| Adultos           | 60 - 170 U/L | 73 - 207 U/L | 98 - 279 U/L |

Factores que pueden afectar los valores de referencia son: ejercicio, periodos de crecimiento en niños y embarazo.

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

### CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

**Rango de medida:** Desde el límite de detección 0,6845 U/L hasta el límite de linealidad de 1200 U/L.

Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir 1/10 con ClNa 9 g/L y multiplicar el resultado final por 10.

#### Precisión:

|             | Intraserie (n= 20) |      | Interserie (n= 20) |       |
|-------------|--------------------|------|--------------------|-------|
| Media (U/L) | 174                | 443  | 175                | 434   |
| SD          | 0,72               | 1,56 | 6,88               | 11,93 |
| CV (%)      | 0,41               | 0,35 | 3,93               | 2,75  |

**Sensibilidad analítica:** 1 U/L = 0,0003  $\Delta A/\text{min}$ .

**Exactitud:** Los reactivos BSM (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de regresión (r)<sup>2</sup>: 0,99938.

Ecuación de la recta de regresión:  $y = 1,025x - 1,105$ .

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

### INTERFERENCIAS

El fluoruro, oxalato, citrato y EDTA inhiben la actividad de la fosfatasa alcalina, por lo que no deben ser utilizados como anticoagulantes.

La hemólisis interfiere debido a la elevada concentración de fosfatasa alcalina en los hematíes<sup>1,2</sup>. Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación de la fosfatasa alcalina<sup>3,4</sup>.

### NOTAS

**BSM dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.**

### BIBLIOGRAFÍA

1. Wenger C. et al. Alkaline phosphatase. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1094-1098.
2. Rosalki S et al. Clin Chem 1993; 39/4: 648-652.
3. Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
4. Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
5. Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
6. Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

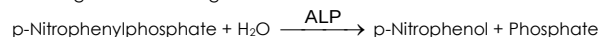
**Alkaline phosph.p-Nitrophenylphosphate.Kinetic.Liquid.DGKC** Ref.: ALP-001  
Quantitative Determination of alkaline phosphatase 5x40 mL / 1x50 mL  
Only for *in vitro* use in clinical laboratory Ref.: ALP-001B  
Store at 2-8°C 1x1000 / 1x250 mL

## ALKALINE PHOSPHATASE



### PRINCIPLE OF THE METHOD

Alkaline phosphatase (ALP) catalyses the hydrolysis of p-nitrophenyl phosphate at pH 10.4, liberating p-nitrophenol and phosphate, according to the following reaction:



The rate of p-nitrophenol formation, measured photometrically, is proportional to the catalytic concentration of alkaline phosphatase present in the sample<sup>1,2</sup>.

### CLINICAL SIGNIFICANCE

Alkaline phosphatase is an enzyme present in almost all weaves of the organism, being particularly high in bone, liver, placenta, intestine and kidney. Both increases and decreases of plasma ALP are of importance clinically.

Causes of increased plasma ALP: Paget's disease of bone, obstructive liver disease, hepatitis, hepatotoxicity caused by drugs or osteomalacia. Causes of decreased plasma ALP: Cretinism and vitamin C deficiency<sup>1,5,6</sup>. Clinical diagnosis should not be made on a single test result; it should integrate clinical and other laboratory data.

### REAGENTS

|            |                               |            |
|------------|-------------------------------|------------|
| <b>R 1</b> | Diethanolamine (DEA) pH 10.4  | 1 mmol/L   |
| Buffer     | Magnesium chloride            | 0,5 mmol/L |
| <b>R 2</b> | p-Nitrophenylphosphate (pNPP) | 10 mmol/L  |
| Substrate  |                               |            |

### PREPARATION

Working reagent (WR)

Mix: 4 vol. (R1) Buffer + 1 vol. (R2) Substrate

Stability: 1 month at 2-8°C or 10 days at room temperature.

### STORAGE AND STABILITY

All the components of the kit are stable until the expiration date on the label when stored tightly closed at 2-8°C, protected from light and contaminations prevented during their use.

Do not use reagents over the expiration date.

#### Signs of reagent deterioration:

- Presence of particles and turbidity.
- Blank absorbance (A) at 405 nm  $\geq 1,50$ .

### ADDITIONAL EQUIPMENT

- Spectrophotometer or colorimeter measuring at 405 nm.
- Thermostatic bath at 25°C, 30°C o 37°C ( $\pm 0,1^\circ\text{C}$ )
- Matched cuvettes 1,0 cm light path.
- General laboratory equipment.

### SAMPLES

Serum or heparinized plasma<sup>1</sup>. Use unhemolyzed serum, separated from the clot as soon as possible. Stability: 3 days at 2-8°C.

### PROCEDURE

- Assay conditions:  
Wavelength: ..... 405 nm  
Cuvette: ..... 1 cm light path  
Constant temperature: ..... 25°C / 30°C / 37°C
- Adjust the instrument to zero with distilled water or air.
- Pipette into a cuvette:

|                          |     |
|--------------------------|-----|
| WR (mL)                  | 1,2 |
| Sample ( $\mu\text{L}$ ) | 20  |
- Mix, incubate for 1 minute.
- Read initial absorbance (A) of the sample, start the stopwatch and read absorbances at 1 min intervals thereafter for 3 min.
- Calculate the difference between absorbances and the average absorbance differences per minute ( $\Delta\text{A}/\text{min}$ ).

### CALCULATIONS

$\Delta\text{A}/\text{min} \times 3300 = \text{U/L de ALP}$

**Units:** One international unit (IU) is the amount of enzyme that transforms 1  $\mu\text{mol}$  of substrate per minute, in standard conditions. The concentration is expressed in units per litre of sample (U/L).

### Temperature conversion factors

To correct results to other temperatures multiply by:

| Assay temperature | Conversion factor to |      |      |
|-------------------|----------------------|------|------|
|                   | 25°C                 | 30°C | 37°C |
| 25°C              | 1,00                 | 1,22 | 1,64 |
| 30°C              | 0,82                 | 1,00 | 1,33 |
| 37°C              | 0,61                 | 0,75 | 1,00 |

### QUALITY CONTROL

Control sera are recommended to monitor the performance of assay procedures.

If control values are found outside the defined range, check the instrument, reagents and technique for problems.

Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

### REFERENCE VALUES<sup>1</sup>

|                       |              |              |              |
|-----------------------|--------------|--------------|--------------|
|                       | 25°C         | 30°C         | 37°C         |
| Children (1-14 years) | < 400 U/L    | < 480 U/L    | < 645 U/L    |
| Adults                | 60 - 170 U/L | 73 - 207 U/L | 98 - 279 U/L |

Factors affecting ALP activities in a normal population include exercise, periods of repaid growth in children and pregnancy.  
These values are for orientation purpose; each laboratory should establish its own reference range.

### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

**Measuring range:** From detection limit of 0,6845 U/L to linearity limit of 1200 U/L.

If the results obtained were greater than linearity limit, dilute the sample 1/10 with NaCl 9 g/L and multiply the result by 10.

#### Precision:

|            | Intra-assay (n=20) |      | Inter-assay (n=20) |       |
|------------|--------------------|------|--------------------|-------|
| Mean (U/L) | 174                | 443  | 175                | 434   |
| SD         | 0,72               | 1,56 | 6,88               | 11,93 |
| CV (%)     | 0,41               | 0,35 | 3,93               | 2,75  |

**Sensitivity:** 1 U/L = 0,0003  $\Delta\text{A}/\text{min}$ .

**Accuracy:** Results obtained using BSM reagents (y) did not show systematic differences when compared with other commercial reagents (x). The results obtained using 50 samples were the following:  
Correlation coefficient ( $r^2$ ): 0,99938.

Regression equation:  $y = 1,025x - 1,105$ .

The results of the performance characteristics depend on the analyzer used.

### INTERFERENCES

Fluoride, oxalate, citrate and EDTA inhibit alkaline phosphate activity and should therefore not be used as anticoagulants. Haemolyses interferes due to the high concentration of alkaline phosphatase in red cells<sup>1,2</sup>.

A list of drugs and other interfering substances with acid phosphatase determination has been reported by Young et. al<sup>3,4</sup>.

### NOTES

**BSM has instruction sheets for several automatic analyzers. Instructions for many of them are available on request.**

### BIBLIOGRAPHY

- Wenger C. et al. Alkaline phosphatase, Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis, Toronto, Princeton 1984; 1094-1098.
- Rosalki S et al. Clin Chem 1993; 39/4: 648-652.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.