

Alkaline phosphatase

p-Nitrophenylphosphate. Kinetic. AMP buffer (IFCC)

Quantitative determination of alkaline phosphatase (ALP)**IVD**

Store at 2-8°C

PRINCIPLE OF THE METHOD

Kinetic photometric test, according to the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicines (IFCC).

Alkaline phosphatase (ALP) catalyses the transfer of the phosphate group from p-nitrophenylphosphate to 2-amino-2-methyl-1-propanol (AMP), liberating p-nitrophenol 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^{1,2}.**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^{1,5,6}.

Clinical diagnosis should not be made on a single test result; it should integrate clinical and other laboratory data.

REAGENTS

R 1 Buffer	2-Amino-2-methyl-1-propanol Zinc sulfate Magnesium acetate N-hydroxyethylethylenediaminetriacetic acid (EDTA)	0,35 mol/L 1 mmol/L 2 mmol/L 2 mmol/L
R 2 Substrate	p-Nitrophenylphosphate (pNPP)	10 mmol/L

PREPARATION

Working reagent (WR):

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

Stability: 21 days at 2-8°C or 5 days at room temperature (15-25°C).

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 freeze the reagents.

Do not use the tablets if appears broken.

Do not use reagents over the expiration date.

Signs of reagent deterioration:

- Presence of particles and turbidity.
- Blank absorbance (A) at 405 nm > 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.

SAMPLESSerum or heparinized plasma¹. Use unhemolyzed serum, separated from the clot as soon as possible. Stability: 3 days at 2-8°C.**PROCEDURE**

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

WR (mL)	1,0
Sample (μL)	20
4. Mix, incubate for 1 minute.
5. Read initial absorbance (A) of the sample, start the stopwatch and read absorbances at 1 minute intervals thereafter for 3 minutes.
6. Calculate the difference between consecutive absorbances and the average absorbance differences per minute ($\Delta A/\text{min}$).

CALCULATIONS

$$\Delta A/\text{min} \times 2764 = \text{ALP ACTIVITY (U/L)}$$

Units: One international unit (IU) is the amount of enzyme that transforms 1 μmol 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: SPINTROL H Normal and Pathologic (Ref. 1002120 and 1002210).

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 VALUES¹25°C 30°C 37°C
Adults 17 - 77 U/L 21 - 94 U/L 26 - 117 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 1,307 U/L to linearity limit of 1400 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)	73	194
SD	1,67	3,03
CV (%)	2,27	1,58

Sensitivity: 1 U/L = 0.0004 ΔA / min.**Accuracy:** Results obtained using SPINREACT 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): 0,98929.

Regression equation: $y = 2,214x + 2,131$.

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

INTERFERENCESFluoride, 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^{1,2}.A list of drugs and other interfering substances with acid phosphatase determination has been reported by Young et al^{3,4}.**NOTES****SPINREACT has instruction sheets for several automatic analyzers. Instructions for many of them are available on request.****BIBLIOGRAPHY**

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.
7. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 1983; 21: 731-748.

PACKAGING

Ref: 41245	R1: 1 x 60 mL
	R2: 1 x 15 mL
Ref: 41246	Cont.
	R1: 1 x 240 mL
	R2: 1 x 60 mL



Fosfatasa alcalina

p-Nitrofenilfosfato. Cinético. AMP buffer (IFCC)

**Determinación cuantitativa de fosfatasa alcalina (FAL)
IVD**

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODOTest fotométrico cinético, acorde a la *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicines (IFCC)*.La fosfatasa alcalina (FAL) cataliza la transferencia del grupo fosfato desde el p-nitrofenilfosfato (*pNPP*) al 2-amino-2-methyl-1-propanol 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^{1,2}.**SIGNIFICADO CLÍNICO**

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

Tanto el aumento como la disminución de los niveles en plasma, tienen significado clínico.

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^{1,5,6}.

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

REACTIVOS

R 1 Tampón	2-Amino-2-metil-1-propanol Zinc sulfato Magnesio acetato N-ácido hidroxietilelenediaminotriacetico (EDTA)	0,35 mol/L 1 mmol/L 2 mmol/L 2 mmol/L
R 2 Substrato	p-Nitrofenilfosfato (<i>pNPP</i>)	10 mmol/L

PREPARACIÓN

Reactivos de trabajo (RT):

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

Estabilidad: 21 días a 2-8°C o 5 días a temperatura ambiente.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

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

No usar las tabletas si aparecen fragmentadas.

No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancias del Blanco a 405 > 1,50.

MATERIAL ADICIONAL

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

MUESTRASSero o plasma heparinizado¹.

Sero libre de hemólisis, separado de los hematies 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)	1,0
Muestra (μL)	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 de la diferencia de absorbancia por minuto (ΔA/min).

CÁLCULOS

$$\Delta A/\text{min} \times 2764 = \text{U/L de FAL}$$

Unidades: La unidad internacional (UI) es la cantidad de enzima que convierte 1 μmol de substrato 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: SPINTROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210).

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 REFERENCIA¹

25°C	30°C	37°C	
Adultos	17 - 77 U/L	21 - 94 U/L	26 - 117 U/L

Factores que pueden afectar los valores de referencia son: ejercicio, períodos 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 1,307 U/L hasta el límite de linearidad 1400 U/L.**Precisión:**

	Intraserie (n= 20)	Interserie (n= 20)
Media (U/L)	73	194
SD	1,67	3,03
CV (%)	2,27	1,58

Sensibilidad analítica: 1 U/L = 0,0004 ΔA/min.**Exactitud:** Los reactivos SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coeficiente de regresión (r): 0,98929.

Ecuación de la recta de regresión: $y = 2,214x + 2,131$.

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 hematies^{1,2}. Se han descrito varias drogas y otras substancias que interfieren en la determinación de la fosfatasa alcalina^{3,4}.**NOTAS****SPINREACT 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.
7. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 1983; 21: 731-748.

PRESENTACIÓN

Ref: 41245	Cont.	R1: 1 x 60 mL
Ref: 41246		R2: 1 x 15 mL

Ref: 41246	Cont.	R1: 1 x 240 mL
		R2: 1 x 60 mL