PRZECHOWYWAĆ W TEMP. 2-8ºC
Odczynniki do pomiaru stężenia ALP Tylko do użytku *in vitro* w laboratorium klinicznym

FOSFATAZA ALKALICZNA (ALP) - AMP

CE FOSFATAZA ALKALICZNA (ALP) - AMP
BUFOR 2-AMINO-2-METYLO-1-PROPANOL (IFCC)

ZASADA METODY

Fosfataza alkaliczna (ALP) katalizuje w środowisku alkalicznym przeniesienie grupy fosforanowej z 4-nitrofenylofosforanu na 2-amino-2-metylo-1-propanol (AMP), uwalniając 4-nitrofenol. Stężenie katalityczne oznaczane jest na podstawie szybkości tworzenia się 4-nitrofenolu, mierzonego przy 405 nm[1].

$$\text{4 – Nitrofenylofosforan + AMP} \xrightarrow{\text{ALP}} \text{Fosforan AMP + 4 - Nitrofenol}$$

ZAWARTOŚĆ OPAKOWANIA

	Nr kat. 11592	Nr kat. 11593	Nr kat. 11598
A. Odczynnik	1 x 40 ml	1 x 160 ml	4 x 100 ml
B. Odczynnik	1 x 10 ml	1 x 40 ml	2 x 50 ml

SKŁAD

A. Odczynnik: 2-Amino-2-metylo-1-propanol 0.4 mol/l, siarczan cynku 1.2 mmol/l, kwas N-hydroksyetyloetylenodiaminotrioctowy 2.5 mmol/l, octan magnezu 2.5 mmol/l, pH 10.4.

B. Odczynnik: 4-Nitrofenylofosforan 60 mmol/l.

PRZECHOWYWANIE

Przechowywać w temp. 2-8ºC.

Odczynniki są stabilne do daty ważności podanej na etykiecie, jeżeli są szczelnie zamknięte oraz jeżeli nie dopuści się do ich zanieczyszczenia podczas użycia.

Oznaki zepsucia:

– Odczynniki: Obecność zawiesiny, zmętnienie, absorbancja ślepej powyżej 1.200 przy 405 nm (kuweta z drogą optyczną 1 cm).

PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

Odczynnik roboczy:

- Nr kat. 11592 i 11593: Wlać zawartość buteleczki z odczynnikiem B do butelki z odczynnikiem A. Delikatnie wymieszać. Inne objętości odczynnika roboczego można przygotować w następującej proporcji: 4 ml odczynnika A + 1 ml odczynnika B. Stabilność przez 2 miesiące w temp. 2-8ºC.
- Nr kat. 11598: Przenieść 25 ml odczynnika z buteleczki B do butelki z odczynnikiem A. Delikatnie wymieszać. Inne objętości odczynnika roboczego można przygotować w następującej proporcji: 4 ml odczynnika A + 1 ml odczynnika B. Stabilność przez 2 miesiące w temp. 2-8ºC.

WYPOSAŻENIE DODATKOWE

– Analizator, spektrofotometr lub fotometr z termostatowanymi gniazdami na 25, 30 lub 37ºC i filtrem o długości fali 405 nm.
– Kuwety z drogą optyczną 1 cm.

MATERIAŁ DO BADAŃ

Surowica lub osocze pobrane zgodnie ze standardowymi procedurami.

Fosfataza alkaliczna w surowicy lub osoczu jest stabilna przez 7 dni w temp. 2-8ºC. Jako antykoagulantu można używać heparyny.

WYKONANIE OZNACZENIA

1. Doprowadzić odczynnik roboczy i aparat do temperatury reakcji.
2. Odpipetować do kuwety: (Uwaga 1)

Odczynnik roboczy	1.0 ml
Próba badana	20 µl

3. Wymieszać i włożyć kuwetę do fotometru.
4. Zarejestrować absorbancję początkową i wykonać 3 kolejne pomiary w odstępach jednominutowych.
5. Obliczyć różnicę pomiędzy kolejnymi pomiarami absorbancji oraz średnią różnicę absorbancji na minutę (ΔA/min).

OBLICZENIA

Stężenie katalityczne ALP w próbie oblicza się przy zastosowaniu poniższego ogólnego wzoru:

$$\Delta A/\text{min} \times \frac{Vt \times 10^6}{\varepsilon \times l \times VS} = U/L$$

Absorbancja molowa (ε) 4-nitrofenolu przy 405 nm wynosi 18450, droga optyczna (l) - 1 cm, całkowita objętość reakcji (Vt) - 1.02, objętość próby badanej (Vs) - 0.02, a 1 U/l równa się 0.0166 µkat/l. Do obliczenia stężenia katalitycznego stosuje się następujące wzory:

ΔA/min	x 2764 = U/l x 46.08 = µkat/l

WARTOŚCI REFERENCYJNE

Temperatura reakcji	mężczyźni	kobiety
25ºC, do	75 U/l = 1.25 µKat/l	68 U/l = 1.13 µKat/l
30ºC, do[2]	87 U/l = 1.45 µKat/l	80 U/l = 1.33 µKat/l
37ºC, do[2]	115 U/l = 1.92 µKat/l	105 U/l = 1.75 µKat/l

Wartości dla temp. 25ºC uzyskuje się na podstawie wartości dla temp. 30ºC przy użyciu współczynnika konwersji. U dzieci dorastających stężenia są wyższe i bardzo zmienne. Podane zakresy mają jedynie charakter orientacyjny; każde laboratorium powinno ustalić własny zakres wartości referencyjnych.

KONTROLA JAKOŚCI

W celu weryfikacji wykonania procedury oznaczenia zaleca się używanie surowicy kontrolnej biochemicznej poziom I (nr kat. 18005, 18009 i 18042) i poziom II (nr kat. 18007, 18010 i 18043).

Każde laboratorium powinno ustalić własny, wewnętrzny system kontroli jakości i procedur naprawczych, jeżeli wartości kontrolne nie mieszczą się w zakresie dopuszczalnych tolerancji.

CHARAKTERYSTYKA METROLOGICZNA

– Granica detekcji: 1.0 U/l = 0.017 µkat/l
– Granica liniowości: 1200 U/l = 20 µkat/l. Przy wyższych wartościach rozcieńczyć próbę wodą destylowaną w stosunku 1:2 i powtórzyć pomiar.
– Powtarzalność (wewnątrzseryjna):

Średnie stężenie	CV	n
61 U/l = 1.02 µkat/l	1.0 %	20
244 U/l = 4.07 µkat/l	0.7 %	20

– Odtwarzalność (międzyseryjna):

Średnie stężenie	CV	n
61 U/l = 1.02 µkat/l	3.4 %	25
244 U/l = 4.07 µkat/l	1.1 %	25

– Czułość: 0.362 ΔmA·L/U·min = 21.7 ΔmA·L/µkat·min
– Poprawność: Wyniki uzyskane przy użyciu tego odczynnika nie wykazały różnic systematycznych w porównaniu z odczynnikami referencyjnymi. Szczegóły eksperymentów porównawczych dostępne są na życzenie.
– Interferencje: Lipemia (triglicerydy < 10 g/l) i bilirubina (< 20 mg/dl) nie interferują. Hemoglobina (> 2.5 g/l) interferuje. Inne leki i substancje mogą interferować[3].

Podana charakterystyka metrologiczna została uzyskana w przypadku użycia analizatora. Wyniki mogą różnić się przy użyciu innego aparatu lub w procedurze manualnej.

CHARAKTERYSTYKA DIAGNOSTYCZNA

Fosfataza alkaliczna katalizuje hydrolizę monoestrów organicznego fosforanu w zasadowym pH. Enzym jest obecny praktycznie we wszystkich tkankach ciała, głównie w błonach komórkowych, a w szczególnie wysokich stężeniach występuje w łożysku, nabłonku jelitowym, kanalikach nerkowych, osteoblastach i wątrobie.

Fosfataza obecna w surowicy zdrowych osób dorosłych powstaje głównie w wątrobie i kościach.

Podwyższone stężenia ALP w surowicy występują u pacjentów z chorobami kości związanymi ze wzmożoną aktywnością osteoblastyczną (choroba Pageta, pierwotna i wtórna nadczynność przytarczyc, guzy kości, krzywica, osteomalacja, złamania kości), a także u pacjentów z chorobami dróg żółciowych i wątroby (żółtaczka zaporowa, żółtaczka, polekowe uszkodzenie wątroby, rak wątroby). Zmiany fizjologiczne takie jak przyrost masy kostnej i ciąża mogą spowodować wzrost poziomu ALP[4,5].

Diagnoza kliniczna nie powinna być stawiana na podstawie wyników pojedynczego badania, ale powinna łączyć zarówno dane kliniczne jak i laboratoryjne.

UWAGI

1. Odczynniki te mogą być stosowane w analizatorach automatycznych. Aplikacje do wielu z nich dostępne są na życzenie.

BIBLIOGRAFIA

1. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 5: IFCC methods for alkaline phosphatase. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983; 21: 731-748.
2. Rosalki SB, Foo AY, Burlina A, at al. Multicenter evaluation of iso-ALP test kit for measurement of bone alkaline phosphatase activity in serum and plasma. Clin Chem 1993; 39:648-652.
3. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Press, 1997.
4. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Press, 1997.
5. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd edition. Burtis CA, Ashwood ER. WB Saunders Co., 1994.