



Kit per la determinazione della fosfatasi alcalina nel siero o plasma - Metodo colorimetrico ottimizzato DEA DGKC*

*Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie

PRINCIPIO

La fosfatasi alcalina (ALP) catalizza l'idrolisi, in ambiente alcalino, del p-nitrofenilfosfato in p-nitrofenolo e fosfato. L'aumento di estinzione è direttamente proporzionale all'attività della fosfatasi alcalina presente nel campione.

REATTIVI - Concentrazione iniziale

R1 Tampone dietanolamina pH 9.8 2.2 mol/l; magnesio cloruro 1.0 mmol/l
R2 p-Nitrofenilfosfato 38.0 mmol/l

CAMPIONI

- Siero o plasma anticoagulato con eparina.

Note

- Non utilizzare campioni emolizzati. Il prelievo deve essere effettuato di preferenza dopo 8 ore di digiuno. Gli anticoagulanti come l'EDTA, il citrato e l'ossalato non devono essere utilizzati poiché inibiscono l'attività dell'enzima.
 - Nei campioni l'ALP è stabile fino a 7 giorni a 2-8°C.

VALORI DI RIFERIMENTO

Siero - plasma [U/l]	25°C	30°C	37°C
Bambini	110-720	145-950	180-1200
Adulti	60-170	80-220	100-290

I valori di riferimento sono da considerarsi indicativi in quanto ogni laboratorio dovrebbe ricercare quelli della popolazione su cui opera. I risultati dei test dovrebbero essere interpretati unitamente alle informazioni derivanti dalle valutazioni cliniche del paziente.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

- Conservare il kit a 2-8°C. Non congelare i reattivi.
 - Dopo l'apertura, i flaconi **R1** ed **R2** sono stabili fino alla data di scadenza indicata se richiudi immediatamente dopo il prelievo, protetti da contaminazione, evaporazione, luce diretta e conservati alla temperatura corretta.
 - Stabilità della soluzione di lavoro (**R1 + R2**): 30 giorni a 2-8°C.

PREPARAZIONE DEI REATTIVI

I reattivi sono liquidi e pronti all'uso. Per l'utilizzo come monoreattivo (procedimento "campione starter") aggiungere ogni 4 ml del reattivo **R1** 1 ml del reattivo **R2**. Togliere i reattivi dal frigo solo il tempo necessario per il loro utilizzo e richiuderli subito dopo.

NOTE

- Il kit con la presente metodica deve essere utilizzato in manuale. Per l'utilizzo in automatico consultare le applicazioni specifiche.
 - Valutare attentamente i risultati se l'estinzione del reattivo di lavoro è > 0.600 a 405 nm.
 - Evitare di esporre i reattivi alla luce diretta, contaminazione ed evaporazione.
 - I volumi indicati nel procedimento possono essere variati proporzionalmente.
 - In caso di reclamo o di richiesta del controllo di qualità del presente kit, indicare il numero di lotto riportato sulla confezione o, in alternativa, il numero di lotto dei singoli componenti.

MATERIALI AUSILIARI

Materiali necessari non contenuti nel kit: soluzioni diluenti, vetreria e monouso, sistemi di dosaggio e misurazione, calibratori per la taratura degli strumenti.

Calibratori consigliati:

REF 20102 Biocal H Human

CONTROLLO DI QUALITÀ

È necessario eseguire i controlli ad ogni utilizzo del kit e verificare che i valori ottenuti siano inclusi nell'intervallo di riferimento riportato nelle istruzioni d'uso.

Sieri consigliati:

REF 20350 Precise Norm REF 20360 Precise Path

PRECAUZIONI ED AVVERTENZE



H318: Provoca gravi lesioni oculari

Consigli di prudenza

P280: Indossare protezione per gli occhi e viso.

P305+P351+P338: IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.

P310: Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI / un medico / ...

I reattivi contengono Sodio Azide (0.095%) come conservante. Evitare l'ingestione ed il contatto con pelle, occhi e mucose.

SMALTIMENTO RIFIUTI

Il prodotto deve essere smaltito secondo le locali normative in materia di gestione dei rifiuti.

PROCEDIMENTO

Lunghezza d'onda λ: 405 (400-410) nm
 Temperatura di lavoro 37°C (25° o 30°C)
 Cammino ottico 1 cm
 Tipo di reazione cinetica (in incremento)

Portare i reattivi a 15-25°C prima del loro utilizzo.

- PROCEDIMENTO MONOREATTIVO "campione starter"

	BIANCO	CAMPIONE
REATTIVO DI LAVORO	1000 µl	1000 µl
ACQUA DISTILLATA	20 µl	--
CAMPIONE	--	20 µl

Agitare poi incubare per 1 min. a 37°C. Leggere l'estinzione del campione (EC) contro acqua distillata al tempo 0 e dopo 1, 2, 3 minuti. Calcolare la variazione media di estinzione per minuto (ΔE/min).

- PROCEDIMENTO BIREATTIVO "substrato starter"

	BIANCO	CAMPIONE
REATTIVO R1	800 µl	800 µl
ACQUA DISTILLATA	20 µl	--
CAMPIONE	--	20 µl

Mescolare poi incubare a 37°C per circa 1 min., quindi aggiungere:

	BIANCO	CAMPIONE
REATTIVO R2	200 µl	200 µl

Agitare poi incubare per 1 min. a 37°C. Leggere l'estinzione del campione (EC) contro acqua distillata al tempo 0 e dopo 1, 2, 3 minuti. Calcolare la variazione media di estinzione per minuto (ΔE/min).

CALCOLO con calibrazione

$$ALP [U/l] = \Delta E/\text{min campione} / \Delta E/\text{min calib} \times \text{conc calib}$$

CALCOLO con fattore (indicativo)

$$ALP [U/l] = \Delta E/\text{min} \times 2757$$

Il fattore e le prestazioni del reattivo sono riferite a 37°C e 405 nm.

PRESTAZIONI DEL REATTIVO

Interferenze

La bilirubina non interferisce con il test sino alla concentrazione di 40 mg/dl.
 I trigliceridi non interferiscono sino alla concentrazione di 2000 mg/dl.
 L'emoglobina non interferisce sino alla concentrazione di 150 mg/dl.
 L'acido ascorbico non interferisce sino alla concentrazione di 30 mg/dl.

Linearità

La reazione è lineare sino alla concentrazione di 2000 U/l (corrispondente ad un ΔE/min di 0.725). Campioni superiori a 2000 U/l devono essere diluiti con soluzione fisiologica. Moltiplicare il risultato per il fattore di diluizione.

Precisione "intra-Assay" (NELLA SERIE)

Determinata su 30 replicati per ciascun controllo (L-N-H) (Low-Normal-High).

Risultati ottenuti:

MEDIA (U/l)	L = 83.3	N = 166.7	H = 611.0
D.S.	3.76	4.15	5.62
C.V.%	4.52	2.49	0.92

Precisione "inter-Assay" (FRA LE SERIE)

Determinata su 15 replicati per ciascun controllo (L-N-H) per 3 giorni. Risultati ottenuti:

MEDIA (U/l)	L = 86.58	N = 164.22	H = 568.98
D.S.	2.36	4.02	9.72
C.V.%	2.73	2.45	1.71

Sensibilità analitica

Soglia di sensibilità espressa dal metodo: 19 U/l.

Correlazione

Un metodo equivalente preso a riferimento, correlato su 21 campioni con il reattivo in esame, ha dato un fattore di correlazione **r = 0.98**

BIBLIOGRAFIA

Deutsche Gesellschaft für klinische Chemie (DGKC). Recommendation of the German Society of Clinical Chemistry. Standardization of methods for measurement of enzymatic activities in biological fluids. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem., 10, 182 (1972). Kubler W: Symp. D. Deutsch Ges. für Lab. Med., 8 (1973). Fischbach F, Zawta B: Klin. Lab., 38, 555 (1992). Szasz G. et al.: Z. Kindrheilk, 111, 233 (1971). Kaplan LA, Pesce AJ: "Clinical Chemistry", Mosby Ed. (1996).

SIMBOLOGIA



Consultare istruzioni per l'uso



Marchio CE (prodotto conforme ai requisiti della Dir. 98/79/CE)



Limiti temperatura di conservazione



Dispositivo medico-diagnostico in vitro



Fabbricante



Kit for measurement of alkaline phosphatase in serum or plasma Colorimetric optimized method DEA DGKC*

*Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie

PRINCIPLE

Alkaline phosphatase (ALP) catalyzes the hydrolysis, in alkaline environment, of p-nitrophenylphosphate into p-nitrophenol and phosphate. The absorbance increasing is directly proportional to the alkaline phosphatase activity in the sample.

REAGENTS

R1 Diethanolamine buffer pH 9.8 2.2 mol/l; magnesium chloride 1.0 mmol/l
R2 P-nitrophenylphosphate 38.0 mmol/l

SAMPLE

- Serum or heparinized plasma.

Note

- Do not use samples with haemolysis. The withdrawal must be made, preferably, after 8 hours of fasting. The anticoagulants as EDTA, citrate and oxalate must not be used because they inhibit the enzyme activity.
 - The ALP is stable in the samples up to 7 days at 2-8°C.

REFERENCE VALUES

Serum - plasma [U/l]	25°C	30°C	37°C
Children	110-720	145-950	180-1200
Adults	60-170	80-220	100-290

References values are considered indicatives since each laboratory should establish references ranges for its own patient's population. The analytical results should be evaluated with other information coming from patient's clinical story.

STORAGE AND STABILITY

- Store the kit at 2-8°C. Do not freeze the reagents.
 - After opening, the vials **R1** and **R2** are stable up to the expiry date if recapped immediately and protected from contamination, evaporation, direct light, and stored at the correct temperature.
 - Working solution stability (**R1+ R2**): 30 days at 2-8°C.

PREPARATION OF REAGENTS

Reagents are liquid and ready to use. About using as monoreagent (sample-starter procedure) add to every 4 ml of **R1** reagent, 1 ml of **R2** reagent. Keep out the reagents from refrigerator only for the use and recap them immediately.

NOTE

- The kit, according to this method, must be used in manual procedures. About automatic using follow specific applications.
 - Evaluate carefully the results if working reagent absorbance is > 0.600 at 405 nm.
 - Avoid direct light, contamination and evaporation.
 - The volumes in the procedure can be changed proportionally.
 - In case of complaint or quality control request, refer to the lot number on the package or the lot number on the singles vials.

AUXILIARY EQUIPMENT

Materials not included in the kit: diluent solutions, laboratory glassware, disposable tips, photometers and calibrators.

Suggested calibrator:

REF 20102 Biocal H Human

QUALITY CONTROLS

It's necessary, every time the kit is used, to make the quality controls and to check that values obtained are within the acceptance range provided in the insert.

Suggested serum:

REF 20350 Precise Norm REF 20360 Precise Path

PRECAUTION IN USE



H318: Causes serious eye damage.

P280: Wear eye protection/ face protection.

P305 + P351 + P338: IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P310: Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician.

The reagents contain Sodium Azide (0.095%) as preservative. Avoid swallowing and contacting with skin, eyes and mucous membranes.

WASTE MANAGEMENT

Please refer to the local legal requirements.

PROCEDURE

Wavelength λ : 405 (400-410) nm
 Working temperature 37°C (25° o 30°C)
 Optical path 1 cm
 Reaction kinetic (increasing)

Bring the reagents at 15-25°C before using them.

- MONOREAGENT PROCEDURE "sample starter"

WORKING REAGENT	BLANK	SAMPLE
DISTILLED WATER	1000 μ l	1000 μ l
SAMPLE	20 μ l	--
	--	20 μ l

Mix, then incubate for 1' a 37°C. Measure the absorbance of sample (EC) against distilled water decrease per minute during 3 minutes. Calculate the average absorbance difference per minute ($\Delta E/\text{min}$).

- BIREAGENT PROCEDURE "substrate starter"

REAGENT R1	BLANK	SAMPLE
DISTILLED WATER	800 μ l	800 μ l
SAMPLE	20 μ l	--
	--	20 μ l

Mix, incubate at 37°C for 1' and then add:
REAGENT R2 200 μ l 200 μ l
 Mix, then incubate for 1' a 37°C. Measure the absorbance of sample (EC) against distilled water decrease per minute during 3 minutes. Calculate the average absorbance difference per minute ($\Delta E/\text{min}$).

CALCULATION with calibration

$$\text{ALP [U/l]} = \Delta E/\text{min sample} / \Delta E/\text{min calib} \times \text{conc calib}$$

CALCULATION with factor (indicative)

$$\text{ALP [U/l]} = \Delta E/\text{min} \times 2757$$

The factor and the reagent performances are related to 37°C and 405 nm.

ANALYTICAL PERFORMANCES

Interferences

Bilirubin does not interfere up to concentration of 40 mg/dl.
 Triglycerides do not interfere up to concentration of 2000 mg/dl.
 Hemoglobin does not interfere up to concentration of 150 mg/dl.
 Ascorbate acid does not interfere up to concentration of 30 mg/dl.

Linearity

Reaction is linear up to a concentration of 2000 U/l (corresponding to $\Delta E/\text{min}$ of 0.725). Samples with values exceeding 2000 U/l must be diluted with saline solution. Multiply, then, the result for diluting factor.

"Intra-Assay" precision (within-Run)

Determined on 30 samples for each control (L-N-H) (Low-Normal-High).

Results:

MEAN (U/l)	L = 83.3	N = 166.7	H = 611.0
S.D.	3.76	4.15	5.62
C.V.%	4.52	2.49	0.92

"Inter-Assay" precision (between-run)

Determined on 15 samples for each control (L-N-H) for 3 days.

Results:

MEAN (U/l)	L = 86.58	N = 164.22	H = 568.98
S.D.	2.36	4.02	9.72
C.V.%	2.73	2.45	1.71

Analytical sensitivity

The test sensitivity in terms of detection limit is 19 U/l.

Correlation

A study based comparing this method with a similar method on 21 samples has given a correlating factor $r = 0.98$

BIBLIOGRAPHY

Deutsche Gesellschaft für klinische Chemie (DGKC). Recommendation of the German Society of Clinical Chemistry. Standardization of methods for measurement of enzymatic activities in biological fluids. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem., 10, 182 (1972). Kubler W: Symp. D. Deutsch Ges. für Lab. Med., 8 (1973). Fischbach F, Zawta B: Klin. Lab., 38, 555 (1992). Szasz G. et al.: Z. Kndrheilik, 111, 233 (1971). Kaplan LA, Pesce AJ: "Clinical Chemistry", Mosby Ed. (1996).

SYMBOLS



Read instruction for use



CE mark (requirement of 98/79 regulation)



Storing temperature limits



In vitro medical device



Producer