

Determinazione quantitativa dell'attività della Fosfatasi Alcalina (ALP) nel siero o plasma. Metodo cinetico colorimetrico ottimizzato IFCC.

REF CC1012 R1:3x20 mL + R2: 1x15 mL

REF CC1010 R1:3x40 mL+ R2: 1x30mL

REF CC1014 R1: 3x80 mL + R2: 1x60 mL

PRINCIPIO DEL METODO

Metodo cinetico fotometrico ottimizzato secondo la International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC). In ambiente alcalino, la Fosfatasi idrolizza il p- Nitrofenilfosfato formando il p- Nitrofenolo che assorbe otticamente a 405 nm. L'incremento dell'Assorbanza della soluzione, misurata a 405 nm, è direttamente proporzionale alla attività della Fosfatasi Alcalina nel campione in esame.

ALP

p-Nitrofenilfosfato + H₂O -----> Fosfato + p-Nitrofenolo

SIGNIFICATO CLINICO

Il dosaggio della Fosfatasi Alcalina (ALP) nel siero è di particolare interesse nello studio di due gruppi di condizioni: malattia ossea e malattia epatobiliare. Tra le malattie ossee, i più alti livelli si riscontrano nella malattia di Paget e nei pazienti con carcinoma osseo osteogenico e aumenti moderati nell'osteomalacia e nel rachitismo (quest'ultimo torna alla normalità durante il trattamento con vitamina D). La crescita ossea fisiologica eleva ALP nel siero di bambini in crescita e un aumento transitorio può essere trovato durante la guarigione delle fratture ossee. Le cause di diminuzione del livello plasmatico di ALP sono: cretinismo, carenza di vitamina D e ipofosfatasi e malattia ossea ereditaria. La risposta del fegato a qualsiasi forma di ostruzione delle vie biliari è di sintetizzare più ALP. L'ostruzione intraepatica del flusso biliare attraverso l'insorgenza di cancro o farmaci aumenta l'ALP sierica. Qualsiasi farmaco epatotossico o che induca la colestasi aumenterà notevolmente l'ALP sierica. Ben oltre 200 farmaci hanno dimostrato di aumentare l'ALP sierica nei pazienti sensibili.

COMPOSIZIONE DEI REAGENTI

Reagent (R1)

2-Amino-2-metil-1-propanolo, pH 10.4	0.90 mol/L
Magnesio acetato	1.6 mmol/L
Zinco solfato	0.4 mmol/L
HEDTA	2.0 mmol/L

Reagent (R2)

p-Nitrofenilfosfato	16 mmol/L
---------------------	-----------

PREPARAZIONE REAGENTI E STABILITA'

Reagenti liquidi e pronti all'uso, stabili fino alla data di scadenza riportata, se conservati come riportato in etichetta e si evitano contaminazione, evaporazioni ed esposizione prolungata alla luce diretta. Non congelare i reagenti.

Per la procedura Campione Starter, preparare una Soluzione di Lavoro miscelando 4 parti di R1 ed 1 parte di R2 (per esempio 20 mL di R1 + 5 mL di R2). Stabilità: 5 gg a 15-25° C, 30 giorni a 2-8°C.

La Soluzione di Lavoro deve essere scartata se appaiono segni di deterioramento quali presenza di particelle (torbidità), mancato ottenimento dei valori dei controlli, Bianco Reagente > 1.300 a 405 nm in cuvetta da 1 cm.

Per la Procedura Reagente Starter, i reagenti R1 ed R2 sono pronti all'uso e stabili fino alla data di scadenza riportata in etichetta se si evitano contaminazione, degradazione da luce diretta ed evaporazione

Dopo l'apertura dei flaconi, si consiglia di prelevare il volume necessario, di richiudere immediatamente i flaconi e di riportarli in frigo al fine di evitare contaminazione, degradazione da luce diretta ed evaporazione.

CAMPIONI

Siero o Plasma da eparina. Altri anticoagulanti, come l'EDTA, l'ossalato e il citrato, inibiscono l'enzima complessando Mg⁺⁺ e non dovrebbero essere usati.

Si ha una perdita di attività di circa il 10% entro 2 - 3 gg a + 15° a + 25°C. Stabilità dell'enzima nei campioni: 7 gg a + 4°/ + 8° C e di 2 mesi a -20° C. Eliminare i campioni contaminati.

PROCEDURA

Lunghezza d'onda:	405 nm (400 – 420 nm)
Temperatura:	37°C
Misura:	contro acqua distillata

Procedimento come Monoreagente (Campione Starter).

Pipettare come segue:

Soluzione Lavoro	1000 µL
Campione /Calibratore	20 µL

Azzerare il fotometro con acqua distillata. Miscelare, trasferire in lettura, attendere 1 minuto di lag-phase e leggere l'Assorbanza iniziale (Abs1) e le Abs dopo 1,2 e 3 minuti esatti. Calcolare i Δ Abs/minuto ed effettuare la media aritmetica.

Procedimento come bi-reagente (Reagente Starter).

Pipettare come segue:

Reagente R1	800 µL
Campione /Calibratore	20 µL

Miscelare, incubare a 37° C, attendere 60 secondi, quindi aggiungere:

Reagente R2	200 µL
-------------	--------

Miscelare, trasferire in lettura, attendere 1 minuto di lag-phase e leggere l'Assorbanza iniziale (Abs1) e le Abs dopo 1,2 e 3 minuti esatti. Calcolare i Δ Abs/minuto ed effettuare la media aritmetica.

CALCOLO

Fattore di Calcolo (lettura a 405 nm in cuvette di 1 cm di percorso ottico):

$$ALP (U/L) = \text{Media } \Delta \text{ Abs/minuto} \times 2757$$

Calibratore Multiparametrico:

Ricavare il Fattore di Calcolo dall'uso di un Calibratore Multiparametrico.

$$\text{Fattore Calcolo} = \frac{\text{Concentrazione Calibratore}}{\text{Media } \Delta \text{ Abs/minuto Calibratore}}$$

$$ALP (U/L) = \text{Media } \Delta \text{ Abs/minuto} \times \text{Fattore Calcolo}$$

Fattore di conversione: U/L x 0,0167 = µKat/L = µmol/sec/L

CALIBRAZIONE CON CALIBRATORE

I risultati dipendono dalla accuratezza della calibrazione, dal corretto settaggio del test sullo strumento, dal giusto rapporto volumetrico reagente/campione e dalla corretta temperatura di analisi.

Usare il Calibratore **MTD Diagnostics:**

Chemistry Multicalibrator - REF CAL1010 (10 x 3 mL).

CONTROLLO QUALITA'

Sieri di controllo normali e patologici ad attività enzimatica nota, devono essere analizzati regolarmente in ogni seduta analitica.

Utilizzare il materiale di controllo di qualità di **MTD Diagnostics:**

Chemistry Control N - REF CNN1010 10x5 mL (Livello 1)

Chemistry Control P - REF CNP1020 10x5 mL (Livello 2)

VALORI DI RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICI

<u>Età</u>		<u>Donne</u>	<u>Uomini</u>
1 – 30 giorni	[U/L]	48 – 406	75 – 319
1 mese – 1 anno	[U/L]	124 – 341	82 – 383
1 – 3 anni	[U/L]	108 – 317	104 – 345
4 – 6 anni	[U/L]	96 – 297	93 – 309
7 – 9 anni	[U/L]	69 – 325	86 – 315
10 – 12 anni	[U/L]	51 – 332	42 – 362
13 – 15 anni	[U/L]	50 – 162	74 – 390
16 – 18 anni	[U/L]	47 – 119	52 – 171
20 – 50 anni	[U/L]	42 – 98	53 – 128
>60 anni	[U/L]	53 – 141	56 – 119

Ogni laboratorio dovrebbe stabilire un range di valori attesi in base alla propria popolazione di pazienti e, se necessario, determinare il proprio intervallo di riferimento. A fini diagnostici, i risultati devono sempre essere valutati insieme alla storia medica del paziente, all'esame clinico e ad altri risultati

PRESTAZIONI

PRECISIONE:

Livello basso: Campioni= 20; Media = 114; D.S. = 1,71; CV = 1,5%

Livello alto: Campioni= 20; Media = 275; D.S. = 2,91; CV = 1,06%

ACCURATEZZA (CORRELAZIONE): Una comparazione tra questo metodo (x) ed un metodo certificato del commercio (y) ha dato la seguente correlazione:

$$y = 1.01 x - 1.51 \quad r = 0.999$$

SENSIBILITA': 3 U/L

LINEARITA': 3 – 700 U/L

INTERFERENZA E SPECIFICITA'

Nessuna interferenza osservata con presenza di nei campioni di Acido Ascorbico fino a 30 mg/dL, Bilirubina fino a 40 mg/dL, Emoglobina fino a 150 mg/dL e Trigliceridi fino a 2.000 mg/dL.

NOTE

1. Questo metodo può essere utilizzato con diversi strumenti. Qualsiasi applicazione a uno strumento deve essere validata per dimostrare che i risultati soddisfano le caratteristiche di prestazione del metodo. Si

consiglia di validare periodicamente lo strumento. Contattare il proprio distributore per qualsiasi domanda sul metodo di applicazione.

2. La diagnosi clinica non dovrebbe essere fatta sui risultati di un singolo risultato del test, ma dovrebbe integrare sia i dati clinici che quelli di laboratorio

PRECAUZIONI

Il prodotto non contiene altre sostanze o miscele pericolose secondo la regolamentazione CE n° 1272/2008 (CLP) ovvero le loro concentrazioni sono tali da non essere considerate persistenti, bioaccumulanti o tossiche (PBT). Pertanto, esso non è soggetto alla etichettatura speciale prevista dalla suddetta regolamentazione. Il prodotto è etichettato secondo la direttiva per la marcatura CE (98/79/CE). Sodio Azide inferiore a 0.1%.

Tuttavia, in osservanza alle normali norme di prudenza che ognuno deve osservare allorchè maneggi qualunque sostanza chimica o reagente di laboratorio, in caso di contatto dei Reagenti con l'operatore, occorre applicare i seguenti interventi di primo soccorso:

S26 (P305 – P351 – P338): In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare il medico.

S28 (P302 – P352): In caso di contatto con la pelle, lavarsi immediatamente ed abbondantemente.

S36/37/39 (P280): Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.

S46 (P301 – P310): In caso d'ingestione consultare immediatamente il medico e mostrargli il contenitore o l'etichetta. Se la vittima è cosciente, lavare la bocca con acqua.

S56 (P273): Smaltire questo materiale e relativi contenitori in un punto di raccolta autorizzato per rifiuti pericolosi o speciali.

S63 (P304 – P340): In caso di incidente per inalazione, allontanare l'infortunato dalla zona contaminata e mantenerlo a riposo.

Tutti i campioni in esame, calibratori e controlli devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo capace di trasmettere HIV ed epatiti

PER OGNI ALTRA INDICAZIONE, RICHIEDERE LA SCHEDE DI SICUREZZA AL PRODUTTORE.

SIMBOLOGIA

	Marchio CE (prodotto conforme ai requisiti della Dir. 98/79 CE)		
	Dispositivo medico diagnostico in vitro		Limiti temperatura di conservazione
	Consultare istruzioni per l'uso		Dimensione / numero test
REF	Numero di catalogo		Scadenza
LOT	Numero di lotto		Fabbricante

BIBLIOGRAFIA

Thomas L. Clinical Laboratory Diagnostics. 1st ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft; 1998. p. 36-46.

Moss DW, Henderson AR. Clinical enzymology. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia: W.B Saunders Company; 1999. p. 617-721.

Tietz NW, Rinker D, Shaw LM. IFCC method for alkaline phosphatase. J ClinChemClinBiochem 1983;21:731-48.

Burtis CA, Ashwood ER. Eds. Tietz textbook of clinical chemistry. 3rd ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1999. p.1829.