Diagnosticum Zrt.
H-1047 Budapest, Attila u. 126.
+36-1-369-0739, +36-1-380-4500
+36-1-369-4383
business@diagnosticum.hu

ALKALIKUS FOSZFATÁZ (ALP) CE

STABIL FOLYÉKONY REAGENS

Kódszám:	48261	48263	48262
Kiszerelés:	125 ml	10x25 ml	600 ml
	(1x100ml+1x25ml)	(10x20ml+10x5ml)	(1x480ml+1x120ml)

A szérum alkalikus foszfatáz aktivitásának meghatározására szolgáló reagenskészlet. Optimalizált DGKC módszer.

Az alkalikus foszfatáz sejtmembránhoz kötött enzim, amely a legtöbb szövetben előfordul. Háromféle szöveti eredetű izoenzime van: vékonybél, placenta, csont /máj/ vese. Dimer molekula, Zn^{++} ionokat tartalmaz, amik szerepet játszanak a stabil szerkezet fenntartásában és a katalízisben. A szérumban található enzim csont, máj és vékonybél eredetű. Terhességben a placenta eredetű izoenzim dominál (65°C-on hőstabil). Az izoenzimeket korábban különböző gátlókkal, hőkezeléssel választották el. Meghatározásukra egyre elterjedtebb módszer az elektroforézis. Az enzimaktivitás növekedés elsősorban egyes máj- és csontbetegségek velejárója, de pajzsmirigy, intestinális betegségek, súlyos baktériumfertőzés esetén is mérhető emelkedett enzimaktivitás.

A meghatározás elve

Az enzim lúgos pH-n a monofoszfátok hidrolízisét katalizálja. A DGKC ajánlás szerinti kinetikus, optimalizált módszer alapján a vérben lévő alkalikus foszfatáz katalizálja a p-nitrofenil-foszfát (pNPP) szubsztrát hidrolízisét, melynek során p-nitrofenol (fenoxi formában) és szervetlen foszfát keletkezik. A Mg^{++} ionok növelik az aktivitást. A 405 nm-en mért abszorbancianövekedés arányos a szérum alkalikus foszfatáz aktivitásával.

$$\text{p-nitrofenil-foszfát} + H_2O \xrightarrow{ALP + Mg^{2+}} \text{p-nitrofenol} + \text{foszfát}$$

Referencia-értéktartomány

Gyermekek:	**200-1000 U/l (3,4-17,0 µkat/l)**
Felnőttek:	**100-300 U/l (1,7-5,1 µkat/l)**

Minden laboratóriumnak ajánlott a saját normálérték-tartományát meghatározni.

Reagensek

1. Reagens (R1)

Dietanolamin puffer (pH= 9,80)	1,0 mol/l
Magnézium-klorid	0,6 mmol/l

2. Reagens (R2)

p-nitrofenil-foszfát	10,0 mmol/l

Biztonsági információk

Reagens 1:

Veszély. Dietanolamint tartalmaz. Lenyelve ártalmas. Bőrirritáló hatású. Súlyos szemkárosodást okoz. Ismétlődő vagy hosszabb expozíció esetén károsíthatja a szerveket. Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező. SZEMBE KERÜLÉS esetén: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása.

Minta

Hemolízismentes szérum. Stabilitás: 4 nap (2-8°C)

Reagensek stabilitása

A reagensek fénytől védve és 2-8°C-on tárolva

felbontás nélkül:	a címkén jelzett ideig,
felbontás után:	30 napig használható.
kalibrációs gyakoriság:	7 nap
onboard stabilitás:	7-28 nap

A stabilitások kizárólag új rendszerflakon használata esetén érvényesek!

A VIZSGÁLAT KIVITELEZÉSE

A munkareagens elkészítése

● Egykomponensű reagens készítése:

Keverjünk össze négy térfogatnyi R1 reagenst egy térfogatnyi R2 reagenssel.

Stabilitása: 2-8°C-on	14 nap
20-25°C-on	48 óra

● Eljárás két reagens alkalmazásával:

A reagensek felhasználásra készek.

Fénytől védve tárolandó!

Amennyiben a munkareagens 405 nm-en mért abszorbanciája meghaladja az 1,3-at, a reagens nem használható.

A mérési eljárás

Hullámhossz:	405-410 nm
Hőmérséklet:	37°C
Fényút:	1 cm
Mérési mód:	kinetikus (növekvő)

Bemérés egy reagens esetén:

	standard	**minta**
munkareagens	1ml	1ml
standard	20µl	
minta		20µl

Összekeverés és egyperces inkubálás után olvassuk le az abszorbanciaértékeket levegővel vagy vízzel szemben kétszer percenként. Számítsuk ki az egy percre eső abszorbanciaváltozást (ΔA/perc).

Bemérés két reagens esetén:

R1	800 µl
Minta	20 µl

Keverjük össze és inkubáljuk 1 percig.

R2	200 µl

Összekeverés és egyperces inkubálás után olvassuk le az abszorbanciaértékeket levegővel vagy vízzel szemben kétszer percenként. Számítsuk ki az egy percre eső abszorbanciaváltozást (ΔA/perc).

Kalibráció (DGKC módszer,dietanolamin puffer, 37°C-on)

S1:Desztillált víz

S2: Diagnosticum DunaCal (katalógusszám: Dcal) vagy
Roche C.F.A.S.(Calibrator for automated system) vagy
Randox Calibration Serum Level I vagy
Randox Calibration Serum Level II

Ajánlott új kalibrációt végezni:
- új gyártási számú készlet felbontásakor,
- ahogy ezt a laboratórium belső minőségügyi rendszere előírja.

Az eredmény kiszámítása kalibrációval

$$\frac{\Delta A_{minta}}{\Delta A_{standard}} \times C_{standard} = C_{minta}$$

A=abszorbancia, C=koncentráció

Az eredmény kiszámítása faktor használatával

405 nm: ΔA/perc x 3250 = U/l

Belső minőségellenőrzés

A minőségellenőrzés ajánlott minden laboratóriumnak. Két különböző szintű (egy normál és egy emelkedett) kontrollt javaslunk. A kontrollok mért értékeinek a gyártó által meghatározott tartományba kell esniük. Ha a tartományon kívül esnek az értékek, ajánlott korrigálni a méréseket. Ajánlott kontrollok: Diagnosticum DunaCont N (Katalógusszám: Dcon-N) and DunaCont P (Katalógusszám: Dcon-P).

A REAGENS TELJESÍTMÉNYJELLEMZŐI

A méréseket Olympus 600-as automatán végeztük (37°C). Átváltás: [U/l]=[µkat/l]×60

Linearitási tartomány

A módszer 35 – 1800 U/l (0,58 – 30 µkat/l) tartományban lineáris

Kimutatási határ

A kimutatási határ 0,001 U/l

Érzékenység

Minden laboratórium számára ajánlott meghatározni saját érzékenységi határt, mivel ezt az alkalmazott spektrofotométer érzékenysége is befolyásolja. A kézi mérés körülményei között 0,001 Abs/min 405 nm-en mért abszorbanciaváltozás megegyezik 3,00 U/l (0,05µkat/l) alkalikus foszfatáz aktivitással.

Precizitás

	Reprodukálhatóság		
n=20	Átlag aktivitás (U/l)	SD	CV %
1. minta	176	4,03	2,29
2. minta	416	5,95	1,43

	Ismételhetőség		
n=20	Átlag aktivitás (U/l)	SD	CV %
1. minta	191	1,75	0,91
2. minta	642	6,17	0,96

Korreláció

Összehasonlítottuk reagensünket másik gyártó alkalikus foszfatáz reagensével. A legalacsonyabb alkalikus foszfatáz aktivitás 36 U/l, a legmagasabb alkalikus foszfatáz aktivitás 1925 U/l volt.

A korrelációs regresszió adatai a következők:

korrelációs koefficiens:	r = 0,9998,
lineáris regresszió:	y (U/l) =0,998x+3,949

(x= más gyártó reagense, y= saját reagens).

Szelektivitás

Bilirubin 0,075 g/l–ig (128,3 µmol/l), lipid 10 g/l–ig, glükóz 10 g/l–ig (55,5 mmol/l) aszkorbinsav 0,5 g/l–ig (2,84 mmol/l) nem befolyásolja a mérést.

Megjegyzés

A meghatározást a vérvételt követően a lehető legrövidebb időn belül ajánlatos elvégezni. Az izoenzimek stabilitása különböző. A kelátképző anyagok (EDTA) zavarják a meghatározást. Ne használja a reagenst a csomagolása címkéjén feltüntetett lejárati dátum eltelte után. A készítményeket, tesztoldatokat és reagenseket csak az itt leírt teszthez szabad felhasználni.

Csak *in vitro* diagnosztikai használatra alkalmas.

A címkéken a következő szimbólumok lehetnek

IVD	In vitro diagnosztikai orvostechnikai eszköz	LOT	Gyártási szám
	Gyártó	REF	Kódszám
CE	CE-jelölés		Tárolási irány
	Tárolási hőmérséklet		Biológiai veszély
	Lejárati idő (év/hónap)		

Irodalom

HaussamentT.U. et a L Clin. Chim. Act. 35,271-273,(1977)
Szabó A.: Klinikai laboratóriumi vizsgálatok és paraméterek (2010)

Verzió: 98-DL-2016-07
Felülvizsgálat dátuma: 2016-12

Diagnosticum Zrt.
H-1047 Budapest, Attila u. 126.
+36-1-369-0739, +36-1-380-4500
+36-1-369-4383
business@diagnosticum.hu

ALKALINE PHOSPHATASE (ALP) CE

STABLE LIQUID REAGENT

Cat. No.::	48261, 210223	48263, 210203	48262, 210264
Size	125 ml	10x25 ml	600 ml
	(1x100ml+1x25ml)	(10x20ml+10x5ml)	(1x480ml+1x120ml)

Reagent kit for the quantitative determination of alkaline phosphatase activity in serum, DGKC method.

Alkaline phosphatase is a membrane-bound enzyme which is present in most tissues. It has three different isoenzymes derived from small intestine-placenta-bone/liver/kidney. It is a dimer molecule containing Zn^{++} ions, which play a role in the maintenance of structure and catalysis. The enzyme found in human serum is derived from bone, liver and small intestine. During pregnancy the enzyme from the placenta dominates (it is heat stable at 65°C). In the past the isoenzymes were separated using various inhibitors and heat. The role of electrophoresis is growing in determining the concentrations. The increase in enzyme activity is prevalent in various hepatic and bone decrease states. The level is also increased in certain diseases of the thyroid gland, intestinal tract and in several bacterial infection.

Principle
The enzyme catalyses the hydrolysis of monophosphates at an alkaline pH. In the past various substrates were used (including glycerophosphate, phenylphosphate), according to the recommendation by DGKC which is a kinetic method. The Alkaline phosphatase present in the sample catalyses the hydrolysis of p-Nitrophenylphosphate (pNPP) during which p-Nitrophenol and Phosphate are released. Mg^{++} ions enhance activity. The increase in absorbance at 405 nm correlates with the activity of serum alkaline phosphatase.
Kinetic determination of the alkaline phosphatase based upon DGKC and SCE Recommendation (p-NPP).

$$p\text{-nitrophenylphosphate} + H_2O \xrightarrow{ALP+Mg^{++}} p\text{-nitrophenol} + inorganic\ phosphate$$

Reference values
Children: **200-1000 U/l (3,4-17,0 µkat/l)**
Adults: **100-300 U/l (1,7-5,1 µkat/l)**
It is recommended that each laboratory should assign its own normal range.

Reagents
1. Reagent (R1)
Diethanolamine buffer, pH=9.80 1 mol/l
Magnesium chloride 0.6 mmol/l
2. Reagent (R2)
p-Nitrophenylphosphate (solution) 10 mmol/l

Safety instructions:
Reagent 1: Danger. Contains Diethanolamine. Harmful if swallowed. Causes skin irritation. Causes serious eye damage. May cause damage to organs through prolonged or repeated exposure. Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses if present and easy to do – continue rinsing.

Samples
Serum free of haemolysis. Stability: 4 days (2-8°C)

Stability
without opening: till the expiry date indicated on the label
after opening: 30 days
calibration frequency: 7 days
onboard stability: 7-28 days
Stability data are valid only when using new system bottle!
The absorbance at 410 nm should not be higher than 1,3

PROCEDURE

The reagents are ready to use
Assay conditions
Wavelength: 405-410 nm
Temperature: 37 °C
Cuvette: 1 cm light path
Read against: distilled water or air
Method: kinetic (increasing)

Working reagent:
Mix R1 and R2 in 4:1 ratio.
Stability: at 2-8°C 14 days
at 20-25°C 48 hours

	standard	sample
working reagent	1ml	1ml
standard	20µl	
sample		20µl

Mix and after one minute incubation, read the absorbance agains air or water for two minutes. Determine the change of optical density per minute (ΔA/min).

Two-reagent procedure

Reagent 1	800 µl
Sample	20 µl

Mix and wait 1 minute.

Reagent 2	200 µl

Mix and after a 60-second incubation read the change of optical density (ΔA) during 2 minutes. Determine the change of optical density per minute (ΔA/min).
Calibration: (37°C, DGKC method, DEA puffer)
S1: Distilled water
S2: Diagnosticum DunaCal Cat. No.: Dcal or
Roche C.F.A.S. (Calibrator for automated system) or
Randox Calibration Serum Level I or
Randox Calibration Serum Level II

Calibration frequency
Two-point calibration is recommended:
- after reagent lot change,
- as required following quality control procedures.

Calculation using calibration

$$\frac{\Delta A_{sample}}{\Delta A_{standard}} xC_{standard} = C_{sample}$$

A = Absorbance, C = Concentration

Calculation using factor
405 nm: ΔA/minute x 3250 = U/l; 405 nm: ΔA/minute x 54,2 = µkat/l

Quality control
A quality control program is recommended for all clinical laboratories. The analysis of control material in both the normal and abnormal ranges with each assay is recommended for monitoring the performance of the procedure. Each laboratory should establish corrective measures to be taken if values fall outside the limits. Recommended controls: Diagnosticum DunaCont N (Cat. No.: Dcon-N) and DunaCont P (Cat. No.: Dcon-P)

PERFORMANCES DATA

The following data were obtained using the Olympus 600 analyzer. Conversion factor: [U/l]=[µkat/l]×60

Linearity
The method is linear in the range 35 – 1800 U/l (0,58 – 30 µkat/l)

Limit of detection
The limit of detection is 0,001 U/l

Sensitivity
It is recommended that each laboratory establishes its own range of sensitivity as this is limited by the sensitivity of the spectrophotometer used. Under manual conditions however, a change of 0.001 Abs units/min is equivalent to 3.00 U/l (0,05µkat/l) Alkaline-phosphatase activity at 405 nm.
Precision

n=20	Reproducibility		
Sample	Average activity (U/l)	SD	CV%
Sample I.	176	4.03	2.29
Sample II.	416	5.95	1.43

n=20	Repeatability		
Sample	Average activity (U/l)	SD	CV%
Sample I.	191	1.75	0.91
Sample II.	642	6.17	0.96

Correlation
Comparative studies were done to compare our reagent with another commercial alkaline-phosphatase assay on 47 human samples. The alkaline phosphatase activity was between 36 U/l and 1925 U/l.
The results from these studies are detailed below.
Correlation coefficient: r=0.9998
Linear regression: y (U/l)= 0.998x+3.949
(x= other commercial reagent, y= own reagent).
Specificity
Bilirubin 128.3 µmol/l (7,5mg/dl), lipid 1000mg/dl, glucose 55.5 mmol/l (1000mg/dl) and ascorbic acid 2.84 mmol/l (50mg/dl) don't interfere with the assay up to the given levels.
Note
The enzyme activity is best measured within a few hours of taking the blood sample. Do not pipette reagents by mouth! The stability of the isoenzymes is different. Chelating agents (EDTA) interfere with the reaction.
Do not use reagents after the expiry date stated on each reagent container label. Do not use products, test solutions and reagents described above for any purpose other than described herein.
For *in vitro* diagnostic use only.
The following symbols can be used on the labels

IVD	In vitro diagnostic device	LOT	Batch code
	Manufacturer	REF	Catalogue number
CE	CE-marking		This way up
	Temperature limitations		Biological risk
	Use by (year/month)		

Bibliography
Haussament T.U. et. al. Clin. Chem. Acta 35, 271-273 (1977)
Szabó A.: Klinikai laboratóriumi vizsgálatok és paraméterek (2010) (ISBN 978-963-9879-75-1)

Version: 98-DL-2016-07
Date of revision: 2016-12