

REF 10214-4 4 x 20 mL / 4mL

FOSFATASI ALCALINA (ALP)

Ciascun flacone contiene un volume utilizzabile di 20 mL di reagente R1 e 4 mL di reagente R2.

USO PREVISTO

Il reagente EasyRA ALP è indicato per la misurazione quantitativa della fosfatasi alcalina in siero e plasma umani (con litio eparina come anticoagulante) utilizzando l'Analizzatore chimico clinico MEDICA EasyRA[®]. I dosaggi di fosfatasi alcalina o dei suoi isoenzimi trovano applicazione nella diagnosi e nella cura delle patologie epatiche, ossee, paratiroidee ed intestinali. Per uso diagnostico *in vitro*. Solo per uso professionale.

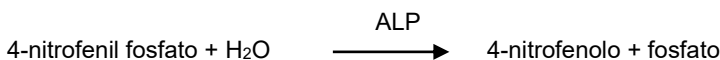
RIEPILOGO E SPIEGAZIONE

La fosfatasi alcalina si riferisce ad un gruppo di fosfatasi il cui pH ottimale ha un valore approssimativo di 10. Si riscontra fosfatasi alcalina in tutti i tessuti corporei.¹ La maggior parte della fosfatasi alcalina nel siero umano adulto deriva dal fegato o dal tratto biliare.² I livelli normali di fosfatasi alcalina dipendono dall'età e sono elevati nei bambini piccoli e negli adolescenti, i quali manifestano periodi di crescita ossea attiva. I maschi adulti presentano valori più elevati rispetto alle femmine, ad eccezione delle donne incinte, i cui livelli aumentano in ragione della secrezione placentare di fosfatasi alcalina.

Sono presenti valori elevati di fosfatasi alcalina nei disturbi epato-biliari³, quali epatiti, cirrosi, tumori maligni e nelle patologie ossee negli adulti associate all'aumento di attività osteoblastica, tra cui carcinoma metastatico, rachitismo, morbo di Paget e osteomalacia.³ Si riscontrano valori elevati di fosfatasi alcalina serica anche nel morbo di Hodgkin, nell'insufficienza cardiaca congestizia, nella colite ulcerosa, nell'enterite regionale e nelle infezioni batteriche intra-addominali.⁴

PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

Questo test misura l'attività della fosfatasi alcalina serica attraverso il metodo cinetico simile a quello di Bowers e di McComb.⁵ La fosfatasi alcalina idrolizza il substrato 4-nitrofenil fosfato per formare 4-nitrofenolo e fosfato.



Il componente 4-nitrofenolo è di colore giallo ad un pH di 10,4, con un picco di assorbanza a 405 nm. La velocità di formazione del 4-nitrofenolo è direttamente proporzionale all'attività della fosfatasi alcalina nel campione.

REAGENTI

Reagente tampone per fosfatasi alcalina (R1):

2-ammino-2-metile-1-propanolo,	
pH 10,4	1,1 mol/L
Acetato di magnesio	2,0 mmol/L
Solfato di zinco	0,5 mmol/L
HEDTA	2,5 mmol/L

Reagente substrato per fosfatasi alcalina (R2):

4-nitrofenil fosfato	80 mmol/L
----------------------	-----------

PRECAUZIONI

1. Seguire sempre buone prassi di sicurezza di laboratorio quando si maneggiano reagenti di laboratorio. (CLSI, GP17-A3).
2. I reagenti contengono meno dello 0,1% di azoturo di sodio, che potrebbe reagire con le tubature in rame e piombo formando accumuli altamente esplosivi di azidi metallici. Per informazioni su rischi, pericoli e sicurezza fare riferimento alle schede di sicurezza (SDS).
3. Come per qualunque altra procedura di test diagnostico, i risultati devono essere interpretati alla luce dei risultati prodotti da altri test e dello stato clinico del paziente.
4. Non utilizzare cuvette lavate.

ISTRUZIONI PER LA MANIPOLAZIONE, LA CONSERVAZIONE E LA STABILITÀ DEL REAGENTE

Il reagente viene fornito pronto all'uso. Il reagente in confezione chiusa si mantiene stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta se conservato ad una temperatura di 2-8° C. Rimuovere il tappo del reagente solo durante l'esecuzione di un test. **Tenere i flaconi dei reagenti ben chiusi quando non sono in uso.** Se usato il questo modo, il reagente è stabile on-board nell'Analizzatore chimico clinico EasyRA per il numero di giorni programmati sul chip RFID del flacone di reagente. Non usare il reagente qualora questo si presenti torbido od opaco o nel caso in cui non riesca a recuperare i valori noti di controllo del siero. Proteggere dalla luce.

PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI/STABILITÀ

Per la raccolta del plasma possono essere utilizzate provette rivestite di litio eparina. È necessario usare siero pulito non emolizzato. La fosfatasi alcalina è relativamente stabile in siero o plasma per 7 giorni ad una temperatura di 2-8° C.⁶ Tuttavia, durante la conservazione si osserva un moderato aumento dell'attività enzimatica. Si riscontra altresì un incremento dell'attività della fosfatasi alcalina con alcuni sieri di controllo ricostituiti, conservati sia a temperatura ambiente che in frigorifero.⁷

PROCEDURA

MATERIALE FORNITO

Flacone di reagente per fosfatasi alcalina Medica, REF 10214-4

Ulteriore materiale necessario

Medica EasyQC® Chimica/Elettroliti – Livello A, REF 10793

Medica EasyQC® Chimica/Elettroliti – Livello B, REF 10794

Flacone per analisi colorimetrica di precisione Medica, REF 10764

Flacone di detergente Medica – Chimica e ISE, REF 10660 o

Flacone di detergente – Chimica, REF 10661

Istruzioni per l'uso

Il reagente viene fornito pronto all'uso. Rimuovere il tappo e collocare il reagente nel piatto reagenti dell'Analizzatore chimico clinico EasyRA situato nell'area reagenti. La stabilità on-board (8 giorni massimo) è programmata sul chip RFID del flacone del reagente.

Nota: verificare che non sia presente schiuma nella parte interna del collo del flacone dopo aver rimosso il tappo e aver collocato il flacone sull'Analizzatore chimico clinico EasyRA. Qualora fosse presente schiuma, rimuoverla con un tampone o una pipetta monouso prima di eseguire il test. Usare pipette monouso o tamponi diversi per i reagenti R1 e R2.

Calibrazione

Non applicabile.

Controllo qualità

Si consiglia di eseguire due livelli di controllo del siero umano (normale e anomalo) con l'analisi una volta al giorno, per ogni test paziente e ogni qual volta il lotto di reagenti cambia. Il mancato raggiungimento dell'intervallo corretto di valori nel test del materiale di controllo può essere indice di deterioramento del reagente, malfunzionamento dello strumento o errori procedurali. Quando viene utilizzato il materiale di controllo qualità, il laboratorio deve inoltre attenersi alla normativa locale, nazionale e federale in materia di controllo di qualità.

Risultati

Dopo aver completato l'analisi, l'Analizzatore chimico clinico EasyRA calcola la concentrazione di fosfatasi alcalina dal cambiamento di assorbanza al minuto, dal volume del campione, dal volume di reazione totale, dalla lunghezza di 0,6 cm del cammino ottico e dalla assorbività molare di 18,75.

$$\text{ALP (U/L)} = (\Delta A/\text{min}) \times \frac{(\text{Volumetotale}(\mu\text{L}) \times 1000)}{(\text{assorbività molare} \times \text{camminoottico}(\text{cm}) \times \text{Volumecampione}(\mu\text{L}))}$$

VALORI ATTESI¹

L'intervallo di riferimento per la fosfatasi alcalina serica è il seguente:

Adulti: da 34 a 114 U/L (37 °C)

Tali valori rappresentano delle linee guida. Si consiglia a ciascun laboratorio di stabilire il proprio intervallo di valori attesi, in quanto esistono differenze tra strumenti, laboratori e popolazioni locali.

Limiti procedurali (ad es. se il campione è al di sopra dell'intervallo di misura)

Il test è lineare fino a 800 U/L. Se il cambiamento di assorbanza al minuto ($\Delta A/\text{min}$) è superiore a 0,1915, i risultati vengono contrassegnati con "SD" (deplezione substrato) dall'analizzatore. I cambiamenti di assorbanza al minuto superiori a questo valore sono al di sopra dell'intervallo lineare del test. Se previsto dall'operatore, è possibile che il campione venga ritestato utilizzando un ridotto volume del campione. I risultati del test rieseguito vengono calcolati tenendo conto dell'uso di volumi inferiori del campione. In tal modo l'intervallo accettabile del test di fosfatasi alcalina viene esteso a 1600 U/L.

CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE⁸

Intervallo accettabile

L'intervallo accettabile è compreso tra 10 e 800 U/L. L'intervallo esteso è compreso tra 10 e 1600 U/L quando viene usata la metà del campione (fattore di diluizione 1:1).

Imprecisione/Correlazione (CLSI, EP09-A2)

La tabella seguente elenca i dati ottenuti in un confronto tra le prestazioni del reagente per ALP Medica (y) su un Analizzatore chimico clinico EasyRA che utilizzi solo la lunghezza d'onda principale di 405 nm e quelle dello stesso reagente per ALP (x) sull'Analizzatore chimico clinico EasyRA che utilizzi una lunghezza d'onda principale di 405 nm e una lunghezza d'onda secondaria di 700 nm. I dati di seguito illustrati rappresentano le singole determinazioni ottenute che utilizzi la lunghezza d'onda principale e una lunghezza d'onda secondaria sull'Analizzatore chimico clinico EasyRA a fronte della media di due valori ripetuti ottenuti che utilizzi solo una lunghezza d'onda principale sull'Analizzatore chimico clinico EasyRA.

Numero di campioni	47	Intervallo dei campioni	da 17 a 744 U/L
Pendenza	0,9938	Intercetta y	3,6906
Coefficiente di correlazione	0,9998	Equazione di regressione:	$Y = 0,9938 * X + 3,6906$

La seguente tabella riporta i dati ottenuti nel confronto fra campioni di siero (x) e di plasma trattato con litio eparina (y) utilizzando il reagente Medica per la fosfatasi alcalina sull'Analizzatore chimico clinico EasyRa. I dati seguenti rappresentano una singola determinazione del plasma rispetto alla media di due valori di siero duplicati.

Numero di campioni	74	Intervallo dei campioni	da 13 a 764 U/L
Pendenza	1,0284	Intercetta y	-6,4285
Coefficiente di correlazione	0,9902	Equazione di regressione:	$Y = 1,0284 * X - 6,4285$

NOTA: i risultati della fosfatasi alcalina per il plasma possono essere inferiori dal 5 al 6% rispetto a quelli per il siero⁹. Medica raccomanda ai laboratori clinici di definire i propri intervalli di riferimento per il test della fosfatasi alcalina, in base al tipo di campione.

Imprecisione (CLSI, EP05-A2)

Le misurazioni duplicate di ciascuno dei tre livelli di materiale di controllo qualità sono state analizzate due volte al giorno per 20 giorni. Da questi dati sono state determinate sia la precisione intra-serie che quella totale.

Imprecisione intra-serie:

Livello QC U/L	SD intra-serie U/L	CV intra-serie %
295	2,8	1,0
184	2,1	1,2
73	1,3	1,7

Imprecisione totale:

Livello QC U/L	SD imprecisione totale U/L	CV imprecisione totale %
295	6,2	2,1
184	4,4	2,4
73	2,1	2,9

Linearità (CLSI, EP06)

Lineare da 10 a 800 U/L, basata sulla regressione lineare $Y = 0,9845 \cdot X + 3,3253$.

Limite di bianco (LOB):	3,0 U/L	(CLSI, EP17-A)
Limite di rilevamento (LOD):	4,5 U/L	(CLSI, EP17-A)
Limite di quantificazione (LOQ):	9,1 U/L	(CLSI, EP17-A)

Sostanze interferenti (CLSI, EP07)

Un'interferenza inferiore al 10% è stata classificata come "interferenza non significativa".

L'interferenza con l'emolisi si presenta significativa. Evitare l'uso di campioni di siero emolizzati.

In livelli fino a 20 mg/dL di bilirubina non sono state riscontrate interferenze significative.

In livelli fino a 500 mg/L di trigliceridi non sono state riscontrate interferenze significative (usando Intralipid*).

In livelli fino a 30 mg/dL di acido ascorbico non sono state riscontrate interferenze significative.

*Intralipid è un marchio registrato di Pharmacia AB, Clayton, NC.

Young fornisce un elenco di medicinali e altre sostanze che interferiscono con i test chimici clinici.^{10, 11}

RIFERIMENTI

- 1 Tietz NW. *Textbook of Clinical Chemistry*, 2nd ed. WB Saunders and Co., Philadelphia, PA, p. 831-832 (1994).
- 2 Kaplan MM, Righetti A. *J Clin Inv.* 1955; 34:126.
- 3 Searcy, RL. *Diagnostic Biochemistry*. New York, NY: McGraw-Hill; 1969.
- 4 Kaplan MM. *New Engl J Med.* 1972; 286:200.
- 5 Bowers, G.N., Jr., McComb, R.B.: *A continuous spectrophotometric method for measuring the activity of serum alk. phos.* *Clin Chem* 12:70-89, 1966.
- 6 Gunder WG, Zawata B et al. *The Quality of Diagnostic Samples. 3rd Edition: 2010. p. 32-3*
- 7 Massion, C.G., Grankenfeld, J.K.: *Alkaline phosphatase: Liability in fresh and frozen human serum and in lyophilized control material.* *Clin Chem.* 18: 366, 1972.
- 8 Dati in archivio presso Medica.
- 9 Ciuti R., Rinaldi G. *Serum and Plasma Compared for Use in 19 Common Chemical Tests Performed in the Hitachi 737 analyzer,* *Clin. Chem.* 35:1562(1989).
- 10 Young, DS., Pestaner, L.C., Gibberman, V.; Effects of drugs on clinical laboratory tests. *Clin Chem* 21: 246D, 1975.
- 11 Young DS. Young's Effects on-line. *Effects of Drugs, Physiology, Preanalytical variables and herbs on Clinical Laboratory Tests.* AACC www.fxol.org

PARAMETRI DELL'ANALISI EASYRA (ALP)

Lunghezza d'onda principale (nm)	405
Lunghezza d'onda secondaria (nm)	700
Tipo di reazione	Enzima (0)
Direzione di reazione	Aumento
Bianco reagente	No
Bianco campione	No
Primo interv. max. camb. assorb.	0,075
Tempo di reazione	7,6 min
Stabilità on-board del reagente	8 giorni

Siero/Plasma

Volume del campione (µl)	6,0
Volume diluente 1 (µl)	20
Volume diluente 2 (µl)	20
Volume reagente R1 (µl)	200
Volume reagente R2 (µl)	36
Posizioni decimali (valori predefiniti)	0
Unità (valori predefiniti)	U/L
Fattore di diluizione	1:1 (per estendere l'intervallo di misurazione)
Linearità	da 10 a 800 U/L