



Stanbio Alkaline Phosphatase LiquiColor® Procedure No. 2900

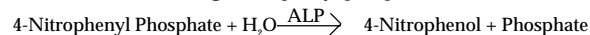
Intended Use

For the Kinetic Quantitative Determination of Alkaline Phosphatase in Serum for Manual and/or Automated Procedures

Summary and Principle

Serum Alkaline Phosphatase (ALP) levels are of interest in the diagnosis of hepatobiliary disorders and bone disease associated with increased osteoblastic activity. Only slight to moderate elevations occur in osteomalacia, rickets, and Fanconi's syndrome. Serum enzyme activities may reach 10 to 12 times the upper limit in hepatic obstruction and return to normal after surgical removal. The sera of growing children and women in the third trimester of pregnancy also show increased levels of ALP activity.¹

Serum ALP activity can be measured using various phosphate esters as substrates.² Stanbio Alkaline Phosphatase procedure measures serum ALP activity by a kinetic method similar to the procedure described by Bowers and McComb using 4-nitrophenyl phosphate as substrate.³



Alkaline Phosphatase hydrolyzes 4-nitrophenyl phosphate to form 4-nitrophenol and phosphates. 4-nitrophenol is yellow in color, at pH 10.4 with an absorbance peak at 405 nm. The rate at which 4-nitrophenol is formed is directly proportional to alkaline phosphatase activity.

Reagent

Alkaline Phosphatase Buffer (R1), Ref. No. 2901

Composition:

2-Amino-2-methyl-1-propanol, pH 10.4	0.35 mol/L
Magnesium Chloride	2.0 mmol/L
Zinc Sulfate	1.0 mmol/L
HEDTA	2.0 mmol/L

Alkaline Phosphatase Substrate (R2), Ref. No. 2902

Composition:

4-Nitrophenyl Phosphate	16 mmol/L
-------------------------	-----------

Precautions: The reagents are for "In Vitro Diagnostic Use". Normal precautions exercised in handling laboratory reagents should be followed. The reagents contain sodium azide which may be toxic if ingested. Sodium azide may also react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Refer to Material Safety Data Sheet for any updated risk, hazard or safety information.

Reagent Preparation: Buffer and Substrate liquid reagents are supplied ready-to-use. Prepare Working Reagent in the ratio of 5 parts Buffer (R1) to 1 part Substrate (R2) (i.e., 25 mL Buffer and 5 mL Substrate).

Reagent Storage and Stability: Reagents are stable until the expiration date on their respective labels, when properly stored at 2-8°C and protected from light. R1 should appear clear/colorless while R2 should appear clear/yellow. Discard if either appears cloudy or contains particulate matter. The Working Reagent is stable for 4 weeks at 2-8°C or 5 days at room temperature (15-30°C).

Material Required But Not Provided

Spectrophotometer capable of absorbance reading at 405 nm and 1 cm lightpath

Constant temperature block or bath, 37°C, or temperature controlled cuvet

Accurate pipetting devices Test tubes Interval timer

Specimen Collection and Storage

Serum or heparinized plasma, free of hemolysis, should be used. Complexing anticoagulants such as citrate, oxalate, fluoride and EDTA must be avoided.⁴ Serum ALP is relatively stable for 7 days, if the sample is refrigerated (2-8°C). However, on storage the enzyme activity increases slightly.⁴ This increment in ALP activity is also observed with some reconstituted control sera, stored both at room temperature and in the refrigerator.⁵ Bilirubin levels up to 40 mg/dL and triglyceride levels up to 2000 mg/dL show no interference in this test.⁷

Interfering Substances: EDTA, citrate, and oxalate inhibit ALP activity.⁶ Certain drugs and other substances are also known to affect ALP values.⁴

Automated Procedure

Special adaptations for automated analyzers are available by contacting Stanbio's Customer Service Department.

Manual Procedure

1. Prepare Alkaline Phosphatase Working Reagent according to instructions.
2. Zero spectrophotometer at 405 nm with distilled water.
3. For each sample and control, add 1.0 mL Working Reagent to cuvet or test tube and warm to 37°C for 3 minutes.
4. Add 20 µL (0.020 mL) serum to its respective tube and mix gently.
5. Read and record absorbance at 1 minute. Continue incubating at 37°C and record absorbance again at 2 and 3 minutes. Rate should be constant.
6. Determine the average absorbance per minute (ΔA/min), multiply by factor 2764 for results in U/L.

NOTE: If cuvet is not temperature controlled, incubate samples at 37°C between readings.

Quality Control: Stanbio Ser-T-Fy® I, Normal Control Serum, Cat. No. G427-86 and Stanbio Ser-T-Fy® II, Abnormal Control Serum, Cat. No. G428-86 are recommended for verifying accuracy and precision. Other commercially available controls with ALP values assayed by this method are also suitable. ALP activity determined in these materials, by this procedure should fall within the ranges stated for the controls. Two levels of controls should be analyzed each day of testing.

Calibration: ALP activity is based on the "micromolar extinction coefficient" of 4-nitrophenol at 405 nm (see "Results" section). The instrument manufacturer's calibration guidelines should be followed to calibrate your analyzer.

Results

Values are derived based on the "absorptivity micromolar extinction coefficient" of 4-nitrophenol at 405 nm (0.01845). Units per liter (U/L) of Alkaline Phosphatase activity is that amount of enzyme which products one mmol/L of 4-nitrophenol per minute.

$$U/L = \frac{\Delta A / \text{Min}}{\text{Absorptivity}} \times \frac{\text{Total Volume}}{\text{Sample Volume}}$$

$$U/L = \frac{\Delta A / \text{Min}}{0.01845} \times \frac{1.020}{0.020}$$

$$U/L = \Delta A / \text{Min} \times 2764$$

Limitations

If the ΔA/min. is greater than .250, dilute 1 part sample with 9 parts isotonic saline and re-assay. Multiply results by 10.

Expected Values⁸

Normal Range (Adult): 34 - 114 U/L (37°C)

This range should serve only as a guideline. It is recommended that each laboratory establish its own range of expected values, since differences exist between instruments, laboratories, and local populations.

Performance Characteristics

Comparison: A group of 63 sera ranging in ALP activity from 0 - 1311 U/L was assayed by the described ALP method and by a similar commercially available ALP reagent. Comparison of the results yielded a correlation coefficient of 0.999 and the regression equation was $y = 0.934x - 3.24$. (Comparison studies were performed according to NCCLS Tentative Guideline, EP9-T.)

Precision: Within-run precision was established by 20 assays on three different levels of commercial serum controls. Total Precision values were obtained by assaying the 3 commercial controls for 5 consecutive days.

	Within-Run		
	Serum 1	Serum 2	Serum 3
Mean ALP (U/L)	139	262	327
Std. Deviation (U/L)	2.4	3.1	3.0
C.V. (%)	1.7	1.2	0.9

	Total Precision		
	Serum 1	Serum 2	Serum 3
Mean ALP (U/L)	146	258	323
Std. Deviation (U/L)	2.6	2.7	4.0
C.V. (%)	1.8	1.0	1.3

Precision studies were performed according to NCCLS Tentative Guideline, EP5-T.

Linearity: Linear to 800 U/L at 37°C.⁷ Performed according to NCCLS Guideline EP6-P.

Sensitivity: Based on an instrument resolution of A = 0.001, the method presented shows a sensitivity of 2.0 U/L.

References

1. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA. p. 831-832 (1994)
2. Fujita H: Uber die microbestimmung der Blut Phosphatase. J. Biochem (Japan) 30: 69, 1939
3. 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.
4. Young, D.S., Pestaner, L.C., Gibberman, V.: Effects of drugs on clinical laboratory tests. Clin Chem 21: 246D, 1975
5. 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.
6. Demetriou JA, Drewes DA, Gin JB: Enzymes. In Clinical Chemistry - Principles and Technics 2nd ed. RJ Henry, DC Cannon, JW Winkelman, Eds. Harper & Row, Hagerstown MD, 1974, p 927.
7. Stanbio Laboratory Data

Manufactured By:

Stanbio Laboratory • 1261 North Main Street • Boerne, Texas 78006 USA
Ph: (830) 249-0772 • Fax (830) 249-0851 • e-mail: stanbio@stanbio.com
http://www.stanbio.com

DN: RBR.2900CE.01 • Last Revision: 01/04 • Procedure No. 2900CE



Stanbio Fosfatasa Alkalina LiquiColor® Procedimiento No. 2900

Para la determinación Cinética cuantitativa de la Fosfatasa Alkalina en suero, para procedimientos Manuales o Automatizados.

Resumen y Principios

Los niveles de Fosfatasa Alkalina en suero (ALP), son de interés en el diagnóstico de desórdenes Hepatobiliares y enfermedades óseas asociadas con el incremento de la actividad osteoblástica. Solamente ocurren elevaciones de Fosfatasa Alkalina de poca a moderadas en osteomalacia, raquitismo y síndrome Fanconi's. La actividad de las enzimas de suero, puede alcanzar de 10 a 12 veces el límite superior en la obstrucción hepática y regresar a la normalidad después de removerlo por medio de cirugía. El suero de niños en crecimiento y de mujeres en el primer trimestre de su embarazo, también muestran elevados niveles de actividad ALP.¹

La actividad de la ALP en suero, se puede medir utilizando varios ésteres fosfatásicos, como sustratos.² El procedimiento para la Fosfatasa Alkalina de Stanbio, mide la actividad de la ALP en el suero, por medio de un método cinético, similar al descrito por Bowes y McComb utilizando 4-Nitrofenilfosfatasa como sustrato.³



La Fosfatasa Alkalina hidroliza el p-nitrofenil fosfato, para formar el p-nitrofenol y fosfatos. El p-nitrofenol es de color amarillo cuando tiene un pH de 10.4 con una absorbancia máxima a 405 nm. La proporción a la cual el p-nitrofenol se forma, es directamente proporcional con la actividad de la Fosfatasa Alkalina.

Reactivos

Buffer de Fosfatasa Alkalina (R1), Ref. No. 2901

Composición:	
2 Aminos, 2 metiles, 1 propanol, pH 10.4	0.35 mol/L
Cloruro de Magnesio	2.0 mmol/L
Sulfato de Zinc	1.0 mmol/L
HEDTA	2.0 mmol/L

Substrato de Fosfatasa Alkalina (R2), Ref. No. 2902

Composición:	
4-Fosfatos de nitrofenil	16 mmol/L

Precauciones: Los reactivos son para uso de diagnóstico in vitro. Precauciones normales en el manejo de los reactivos en el laboratorio deben ser seguidas. Los reactivos contienen azide de sodio que puede ser tóxico si se ingiere. El azide de sodio también puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías formando metales azide altamente explosivos. Refiérase a las hojas de Materiales de seguridad para estar al tanto de la información de seguridad y riesgos.

Preparación del Reactivo: Los reactivos líquidos de buffer y sustratos, son suministrados ya listos para su uso. Prepare el reactivo con el que trabajara a razón de de 5 partes de buffer (R1) y 1 de sustrato (R2) (ej: 25 mL de buffer y 5 mL de sustrato)

Almacenamiento y Estabilidad del Reactivo: El reactivo se mantiene estable hasta la fecha de expiración que esta en la etiqueta y cuando se almacena adecuadamente de 2 a 8°C y protegido contra la luz. El R1 deberá aparecer claro/sin color, mientras que el R2 aparecerá claro/ amarillo. Desechelo si alguno aparece turbio o si contiene partículas de materia. El reactivo a utilizar, esta estable por 4 semanas si se mantiene de 2 a 8°C o 5 días a temperatura ambiente (de 15 a 30°C).

Materiales Requeridos Pereo No Incluidos

Espectrofotometro capaz de leer absorbancias a 405 nm y 1 cm para paso de luz.
Baño Maria (37°C) o celdillas de temperatura controlada.
Pipetas capaces de medir exactamente.
Tubos de prueba.
Cronometro

Recoleccion y Preparacion de la Muestra^{4,5,6,7}

Un suero claro y no hemolizado libre de hemolisis, debiera ser utilizado. Anticoagu-lantes complejos como los citratos, oxalatos, fluoruro y EDTA, deben ser evitados. El suero ALP es relativamente estable por 7 días, si la muestra es refrigerada (de 2 a 8°C). Sin embargo la actividad de las enzimas se incrementa poco durante su almacenamiento. Este incremento en la actividad del ALP, se observa también con algunos controles de suero reconstituídos, almacenados a temperatura ambiente y en el refrigerador. Los niveles de Bilirubina arriba de 40mg/dL y los de triglicéridos hasta 2000 mg/dL, no muestran interferencia en esta prueba.

Interferencia de Sustancias: EDTA, citrato y oxalato, inhiben la actividad de la ALP. Ciertas drogas y otras sustancias también se conoce que afectan los valores ALP.

Procedimiento Automatizado

Adaptaciones especiales para analizadores automatizados están disponibles solo contactando con el Departamento de Servicio al Cliente de Stanbio.

Procedimiento Manual

1. Prepare la Fosfatasa Alkalina con la que va a trabajar de acuerdo a las instrucciones.
2. Calibre el cero del espectrofotometro a 405 nm con agua destilada.
3. Para cada muestra y control, anada 1.0 mL del reactivo reconstituido dentro de la cubeta o en un tubo de prueba e incube por 3 minutos a 37°C.
4. Agregue 20µL (0.020 mL) de suero a sus respectivos tubos y mezcle suavemente.
5. Lea y anote el cambio en la absorbancia cada minuto. Continúe incubando a 37°C y anote los cambios en la absorbancia nuevamente a 2 y 3 minutos. Los valores deberán ser constantes.
6. Determine el promedio de la absorbancia por minuto (A/Min), multiplíquelos por el factor 2764 para obtener resultados en U/L.

NOTA: Si la cubeta no tiene temperatura controlada, incube las muestras a 37°C entre cada lectura.

Control de calidad: El control de suero normal Ser-T-Fy® I, Cat. No. G427-86 y el control de suero abnormal Ser-T-Fy® II, Cat. No. G428-86 son recomendables para para verificar precisión y exactitud. Otros controles comerciales disponibles con valores de ALP ensayados por este método son también convenientes. La actividad de la ALP determinada en esos materiales, por este procedimiento, debiera caer dentro de los rangos fijados para los controles. Dos niveles de controles deben ser analizados cada día que se prueben.

Calibración: La actividad de la ALP, se basa en "un coeficiente de extinción micromolar" de 4-nitrofenol a 405 nm (vea la sección de "Resultados"). La guía de calibración del instrumento por el fabricante, debe ser seguido para calibrar su analizador.

Resultados

Los valores se derivan en base al "coeficiente de extinción de absorptividad micromolar" de 4-nitrofenol a 405 nm (0.01845). La actividad en unidades por litro (U/L) de la fosfatasa alcalina, es la cantidad de enzima que produce 1 nmol/L de 4-nitrofenol por minuto.

$$U/L = \Delta / \text{Min} / \text{Absorptividad} \times \text{Volumen total} / \text{Volumen de la muestra}$$

$$U/L = \Delta A / \text{Min} / 0.01845 \times 1.020 / 0.020$$

$$U/L = \Delta A / \text{Min} \times 2764$$

Limitaciones

Si el DA/Min. es mayor de .250, diluya una parte de la muestra con 9 partes de salina isotónica y vuelva a probar. Multiplique los resultados por 10.

Valores Esperados¹

El Rango normal (en adultos): 34—114 U/L (37°C)

Este rango únicamente debe servir como guía. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos de valores esperados, ya que existen diferencias entre instrumentos, laboratorios y la población local.

Características

Comparación: Un grupo de 63 sueros dentro de un rango de actividad de la ALP de 0 a 1311, fueron probados por el método ALP descrito y por un reactivo comercial similar disponible. Al comparar resultados se produjo un coeficiente de correlación de 0.999 y la ecuación de regresión fue $y = 0.934x - 3.24$. (Otros estudios comparativos fueron realizados de acuerdo con las guías tentativas de la NCCLS, EP5-T.)

Precisión: Dentro de una corrida, la precisión fue establecida por 20 pruebas en 3 diferentes niveles de sueros de control comerciales. Valores totales de precisión se obtuvieron probando 3 controles comerciales por 5 días seguidos.

	Dentro de una corrida		
	Suero 1	Suero 2	Suero 3
Media ALP (U/L)	139	262	327
Desviación Std (U/L)	2.4	2.7	4.0
C.V. (%)	1.7	1.0	1.3

Estudios de precisión fueron realizados de acuerdo con las guías tentativas de la NCCLS, EP6-P.

Linealidad: Es lineal a 800 U/L y a 37°C. Llevado a cabo de acuerdo a las guías EP6-P de la NCCLS.

Sensitividad: Esta basada en la resolución de un instrumento de A=0.001, el método presentado muestra una sensibilidad de 2.0 U/L.

Referencias

1. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA, p.831-832 (1994)
2. Fujita II: Uber die microbestimmung der Blut Phosphatase. J. Biochem (Japan) 30: 69, 1939
3. 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.
4. Young, D.S., Pestaner, L.C., Gibberman, V.: Effects of drugs on clinical laboratory tests. Clin Chem 21: 246D, 1975
5. 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
6. Demetriou JA, Drewes DA, Gin JB: Enzymes. In Clinical Chemistry - Principles and Technics 2nd ed. RJ Henry, DC Cannon, JW Winkelman, Eds. Harper & Row, Hagerstown MD, 1974, p 927
7. Stanbio Laboratory Data.

Para asistencia técnica llame: 800-531-5535 • (830) 249-0772

Fax (830) 249-0851 • e-mail: stanbio@stanbio.com

http://www.stanbio.com

Stanbio Laboratory • 1261 North Main Street • Boerne, Texas 78006

DN: RBR.2900CE.01 • Last Revision: 01/04 • Procedure No. 2900CE