

### Order information:

| Catalog No. | Contents |     |       |    |     |       |
|-------------|----------|-----|-------|----|-----|-------|
| 1622        | R1       | 8 x | 15 ml | R2 | 1 x | 25 ml |
| 1625        | R1       | 4 x | 50 ml | R2 | 4 x | 10 ml |

### Intended use:

In vitro test for the quantitative determination of alkaline phosphatase (ALP) in human serum and plasma.

### Summary:

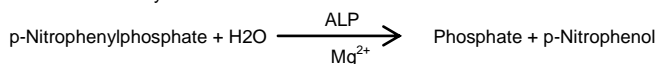
Alkaline phosphatase in serum consists of four structural genotypes: the liver-bone-kidney type, the intestinal type, the placental type and the variant from germ cells. It occurs in osteoblasts, hepatocytes the kidneys, spleen, placenta, prostate, leukocytes and the small intestine. The liver-bone-kidney type is particularly important.

A rise in the alkaline phosphatase activity occurs with all forms of cholestasis, particularly with obstructive jaundice. It is also elevated in diseases of the skeletal system, such as Paget's disease, hyperparathyroidism, rickets and osteomalacia, as well as with fractures and malignant tumours. A considerable rise in the alkaline phosphatase activity is sometimes seen in children and juveniles. It is caused by increased osteoblast activity following accelerated bone growth. Various reference values for the purposes of clinical evaluation have been assigned to differing age groups.

In 1946, Bessey, Lowry and Brock published a method for the determination of alkaline phosphatase using p-nitrophenyl phosphate as substrate buffered with glycine/NaOH. In 1967, Hausamen et al improved upon the method by using diethanolamine as buffer. The "optimized standard method" assay described here meets the 1972 recommendations of the "Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (German Society of Clinical Chemistry)".

### Test principle:

Colorimetric assay in accordance with a standardized method.



In the presence of magnesium and zinc ions, p-nitrophenyl phosphate is hydrolyzed by phosphatases to form phosphate and p-nitrophenol. The p-nitrophenol released is proportional to the ALP activity and can be measured photometrically.

### Reagent Concentration:

|   |            |
|---|------------|
| <b>R1:</b>                                      |            |
| Diethanolamine buffer, pH 9.8                   | 1.0 mol/l  |
| Magnesiumsulfate                                | 0.6 mmol/l |
| Detergents and stabilizers                      | >0.1%      |
| <b>R2:</b>                                      |            |
| p - nitrophenylphosphate<br>(Stabilized liquid) | 2.0 mmol/l |

### Preparation and stability:

#### Sample start:

5 Parts of R1 are mixed with one part R2. The resulting working reagent is stable:

|        |                   |
|--------|-------------------|
| 6 days | at +2°C to +8°C   |
| 4 days | at +20°C to +25°C |

#### Substrate start:

R1: Ready for use.

R2: Ready for use.

Unopened kit components: Up to the expiration date at +2°C to +8°C

Onboard stability: R1: 28 days

R2: 28 days

### Notes:

For in vitro diagnostic use.

The material safety data sheet contains further safety-related information. It is available for download from our homepage <http://www.analyticon-diagnostics.com>.

Exercise the normal precautions required for handling all laboratory reagents.

### Analytical sensitivity (lower detection limit)

Detection limit: 5 U/l or 0.08 µkat/l

The lower detection limit represents the lowest measurable ALP concentration that can be distinguished from zero.

### Specimen:

Collect serum using standard sampling tubes.

Heparinized plasma.

|            |         |                 |
|------------|---------|-----------------|
| Stability: | 2 days  | at +20 to +25°C |
|            | 7 days  | at +4 to +8°C   |
|            | 4 weeks | at -20°C        |

Centrifuge samples containing precipitate before performing the assay.

### Limitations - interference:

Criterion: Recovery within ±10% of initial value.

Icterus: No significant interference up to an index I of 45 (approximate conjugated and unconjugated bilirubin: 45 mg/dl).

Hemolysis: No significant interference up to an index H of 1000 (approximate hemoglobin concentration: 1000 mg/dl).

Lipemia (Intralipid): No significant interference up to an index L of 1000 (approximate triglycerides concentration: 2000 mg/dl). There is poor correlation between turbidity and triglycerides concentration.

The effect of drugs or their metabolic products on the test is not known in all cases.

In case of doubt it is recommended to repeat the test after the medication has been discontinued. However, the medication may only be discontinued according to instructions of the attending physician.

### Testing procedure:

#### Materials provided

• Working solutions as described above

#### Additional materials required

• Calibrators and controls as indicated below

• 0.9% NaCl

#### Manual procedure for sample start:

|                  |                        |  |  |
|------------------|------------------------|--|--|
| Wavelength:      | Hg 405 nm (400-420nm)  |  |  |
| Temperature:     | +25°C / +30°C / +37°C  |  |  |
| Cuvette:         | 1 cm light path        |  |  |
| Zero adjustment: | air or distilled water |  |  |

|                 | Macro   | Semi    | Micro  |
|-----------------|---------|---------|--------|
| Working reagent | 2500 µl | 1000 µl | 500 µl |
| Sample          | 50 µl   | 20 µl   | 10 µl  |

Mix and wait 30 seconds. Read absorbance and start stopwatch simultaneously. Read again absorbance after exactly 1, 2 and 3 minutes. Calculate ΔA/min.

#### Calculation for sample start:

Valid with 1 cm cuvette, Hg 405 nm:  
 $\Delta A/\text{min} \times 2757 = \text{Activity (U/l)}$

#### Manual procedure for substrate start:

|                  |                        |  |  |
|------------------|------------------------|--|--|
| Wavelength:      | Hg 405 nm (400-420nm)  |  |  |
| Temperature:     | +25°C / +30°C / +37°C  |  |  |
| Cuvette:         | 1 cm light path        |  |  |
| Zero adjustment: | air or distilled water |  |  |

|        | Macro   | Semi    | Micro  |
|--------|---------|---------|--------|
| R1     | 2500 µl | 1000 µl | 500 µl |
| Sample | 50 µl   | 20 µl   | 10 µl  |
| R2     | 500 µl  | 200 µl  | 100 µl |

Mix, read initial absorbance and start stopwatch simultaneously. Read again after exactly 1, 2 and 3 minutes and calculate ΔA/min.

#### Calculation for substrate start:

Formula valid with 1 cm cuvette, Hg 405 nm:  
 $\Delta A/\text{min} \times 3298 = \text{Activity (U/l)}$

### Measuring /reportable range:

Manual up to 687 U/l (11.5 µkat/l) at 37°C

Hitachi up to 2000 U/l (33.3 µkat/l)

Determine samples having higher activities via the rerun function. On instruments without rerun function, manually dilute the samples with 0.9% NaCl or distilled/deionized water (e.g. 1 + 4). Multiply the result by the appropriate dilution factor (e.g. factor 5).

### Expected values:

#### Reference range according to Rosalki

|        |       | 25°C  | 30°C  | 37°C  |
|--------|-------|-------|-------|-------|
| U/l    | Men   | <180  | <220  | <270  |
|        | Women | <160  | <195  | <240  |
| µkat/l | Men   | <3.00 | <3.67 | <4.50 |
|        | Women | <2.67 | <3.25 | <4.00 |

For reference values for children, please refer to „Pediatric reference ranges“ 3. Edition. S.J. Soldin, C. Brugnara, I.M. Hicks AACC Press.

Each laboratory should investigate the transferability of the expected values to its own patient population and if necessary determine its own reference range. For diagnostic purposes, the alkaline phosphatase results should always be assessed in conjunction with the patient's medical history, clinical examination and other findings.

# Fluitest<sup>®</sup> ALP DGKC

ALKALINE PHOSPHATASE



## **Imprecision:**

Reproducibility was determined using controls in an internal protocol within (between day n = 20). The following results were obtained:

| Sample   | Between Day |           |      |
|----------|-------------|-----------|------|
|          | Mean<br>U/l | SD<br>U/l | % CV |
| Sample 1 | 143.1       | 2.3       | 1.59 |
| Sample 2 | 448.4       | 6.6       | 1.46 |
| Sample 3 | 449.2       | 5.9       | 1.32 |

## **Method comparison:**

A comparison of the Analyticon Fluitest<sup>®</sup> ALP DGKC (y) with a commercial obtainable assay (x) gave with 80 samples the following result:

$$y = 0.992 x + 2.64; \quad r = 0.991$$

## **Quality Control:**

Human Control Serum

|                              |           |       |
|------------------------------|-----------|-------|
| Contronorm <sup>®</sup> Plus | 5 x 5 ml  | #1205 |
|                              | 20 x 5 ml | #1220 |
| Contropath <sup>®</sup> Plus | 5 x 5 ml  | #1305 |
|                              | 20 x 5 ml | #1320 |

The control intervals and limits must be adapted to the individual laboratory and country-specific requirements. Values obtained should fall within established limits. Each laboratory should establish corrective measures to be taken if values fall outside the limits.

## **Calibration:**

S1: 0.9% NaCl

S2: Bio Cal<sup>®</sup> E                      10 x 3 ml                      #1430

## **Calibration frequency:**

Two-point calibration is recommended

- after reagent lot change
- as required following quality control procedures

## **Disposal:**

Please note the legal regulations.

## **Literature:**

1. Bessey OAH et al. J Biol Chem 1946;164:321.
2. Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie. Standard-Methode zur Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase. Z klin Chem u klin Biochem 1972;10:191.
3. Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical Comparisons of Interferences in Clinical Chemistry Instrumentation. Clin Chem 1986;32:470-474.
4. Greiling H, Gressner AM (Hrsg.). Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie, 3<sup>rd</sup>. Stuttgart/New York: Schattauer Verlag, 1995.
5. Guder WG, Narayanan S, Wissner H, Zawta B. List of Analytes Preanalytical Variables. Broschüre in: Samples: From the Patient to the Laboratory. Darmstadt: GIT Verlag, 1996.
6. Hausamen TU et al. Clin Chim Acta 1967;15:241.
7. Rosalki SB, Foo AY, Burlina A et al. Multicenter Evaluation of Iso ALP Test Kit for Measurement of Bone Alkaline Phosphatase Activity in Serum and Plasma. Clin Chem 1993;39:648-652.

### Bestellinformation:

| Katalog-Nr. | Inhalt |     |       |    |     |       |
|-------------|--------|-----|-------|----|-----|-------|
| 1622        | R1     | 8 x | 15 ml | R2 | 1 x | 25 ml |
| 1625        | R1     | 4 x | 50 ml | R2 | 4 x | 10 ml |

### Anwendungszweck:

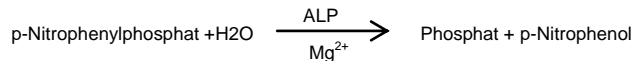
In vitro Test zur quantitativen Bestimmung der alkalischen Phosphatase (ALP) in Humanserum und -plasma.

### Zusammenfassung:

Die alkalische Phosphatase im Serum besteht aus 4 strukturellen Genotypen, dem Leber-Knochen-Nieren-Typ, dem intestinalen Typ, dem plazentalen Typ und der Variante aus den Keimzellen. Sie kommt in den Osteoblasten, Hepatozyten, der Niere, Milz, Placenta, Prostata, den Leukozyten und im Dünndarm vor. Eine besondere Bedeutung hat der Leber-Knochen-Nieren-Typ. Erhöhungen der alkalischen Phosphatase treten bei allen Formen der Cholestase, besonders bei Verschlussikterus, auf. Sie ist ebenfalls bei Erkrankungen des Skelettsystems wie Morbus Paget, Hyperparathyreoidismus Rachitis und Osteomalazie, bei Frakturen und malignen Tumoren erhöht. Einen starken Aktivitätsanstieg der alkalischen Phosphatase kann man zeitweise bei Kindern und Jugendlichen beobachten. Er wird durch vermehrte Osteoblastentätigkeit infolge beschleunigten Knochenwachstums verursacht. Für die verschiedenen Altersstufen werden deshalb auch unterschiedliche Referenzwerte der klinischen Bewertung zugrundegelegt. 1946 wurde von Bessey, Lowry und Brock die Bestimmung der alkalischen Phosphatase mit p-Nitrophenylphosphat als Substrat und Glycin/NaOH als Puffer beschrieben. Hausamen et al verbesserte 1967 mit Einführung des Diethanolamin-Puffers die Bestimmung. Die vorliegende Methode entspricht der "Optimierten Standard- Methode" nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie 1972.

### Testprinzip:

Farb-Test nach einer standardisierten Methode.



p-Nitrophenylphosphat wird in Gegenwart von Magnesiumionen und Zinkionen durch Phosphatasen in Phosphat und p-Nitrophenol gespalten. Das dabei freigesetzte p-Nitrophenol ist proportional der ALP-Aktivität und wird photometrisch gemessen.

### Konzentration der gebrauchsfertigen Lösung:

|  |  |            |
|--|--|------------|
| <b>R1:</b>                             |  |            |
| Diethanolamin Puffer, pH 9.8           |  | 1.0 mol/l  |
| Magnesiumsulfat                        |  | 0.6 mmol/l |
| Detergenzien und Stabilisatoren        |  | >0.1%      |
| <b>R2:</b>                             |  |            |
| p - Nitrophenylphosphat (stabilisiert) |  | 2.0 mmol/l |

### Herstellung und Haltbarkeit:

#### Serumstart:

5 Volumenteile R1 werden mit 1 Volumenteil R2 gemischt.  
 Haltbarkeit des Arbeitsreagenz: 6 Tage bei +2°C bis +8°C  
 4 Tage bei +20°C bis +25°C

#### Substratstart/Hitachi:

R1: Inhalt ist gebrauchsfertig  
 R2: Inhalt ist gebrauchsfertig  
 Ungeöffnete Packungsbestandteile sind bei 2-8°C: bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.  
 Onboard Stabilität: R1 28 Tage  
 R2 28 Tage

### Hinweis:

In vitro Diagnostikum.  
 Weitere sicherheitsrelevante Informationen sind im Sicherheitsdatenblatt enthalten. Dieses steht auf unserer Homepage <http://www.analyticon-diagnostics.com> zum Download bereit.  
 Die beim Umgang mit Laborreagenzien üblichen Vorsichtsmaßnahmen beachten.

### Untersuchungsgut:

Serum, entnommen mit Standard-Probenentnahmeröhrchen.  
 Heparin-Plasma.  
 Haltbarkeit: 2 Tage bei +20 bis +25°C  
 7 Tage bei +4 bis +8°C  
 4 Wochen bei -20°C

Proben die Präzipitate enthalten müssen vor dem Test zentrifugiert werden.

### Sensitivität (analytische Nachweisgrenze):

5 U/l bzw. 0,08 µkat/l  
 Die Nachweisgrenze entspricht der niedrigsten messbaren Aktivität der alkalischen Phosphatase, die von Null unterschieden werden kann.

### Einschränkungen des Verfahrens - Interferenzen:

Als Bewertung gilt: Wiederfindung ± 10% vom Ausgangswert.  
 Ikterus: Keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index I von 45 (ca. 45 mg/dl konjugiertes und unkonjugiertes Bilirubin).  
 Hämolyse: Keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index H von 1000 (ca. 1000 mg/dl Hämoglobin).  
 Lipämie (Intralipid): Keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index L von 1000 (ca. 2000 mg/dl Triglyceride). Es besteht keine zufriedenstellende Übereinstimmung zwischen Trübung und Triglyceridkonzentration.  
 Die Auswirkung von Medikamenten oder deren Metaboliten auf den Test ist nicht in allen Fällen bekannt. Im Zweifelsfall wird deshalb empfohlen, den Test nach Absetzen der Medikation zu wiederholen. Ein Absetzen der Medikation darf allerdings nur nach Anweisung des behandelnden Arztes erfolgen.

### Testverfahren:

#### Gelieferte Materialien

• Reagenzien wie vorher angegeben.

#### Zusätzlich benötigte Materialien

• Kalibrations- und Kontrollmaterial wie nachfolgend beschrieben.  
 • Natriumchlorid-Lösung (0,9%)

### Manuelle Testdurchführung mit Serumstart:

Wellenlänge: Hg 405 nm (400-420nm)  
 Reaktionstemperatur: +25°C / +30°C / +37°C  
 Schichtdicke: 1 cm  
 Messung: gegen Luft o. Aqua dest.

|                | Makro   | Halbmikro | Mikro  |
|----------------|---------|-----------|--------|
| Arbeitsreagenz | 2500 µl | 1000 µl   | 500 µl |
| Probe          | 50 µl   | 20 µl     | 10 µl  |

Mischen. Nach 30 Sekunden Extinktion ablesen und Stoppuhr starten. 3 weitere Ablesungen in Abständen von genau 1 Min. durchführen und ΔE/min. bilden.

### Berechnung für Serumstart:

Für 1 cm Schichtdicke und Hg 405 nm gilt:  
 ΔE/min x 2757 = Aktivität (U/l)

### Manuelle Testdurchführung mit Substratstart:

Wellenlänge: Hg 405 nm (400-420nm)  
 Reaktionstemperatur: +25°C / +30°C / +37°C  
 Schichtdicke: 1 cm  
 Messung: gegen Luft o. Aqua dest.

|       | Makro   | Halbmikro | Mikro  |
|-------|---------|-----------|--------|
| R1    | 2500 µl | 1000 µl   | 500 µl |
| Probe | 50 µl   | 20 µl     | 10 µl  |
| R2    | 500 µl  | 200 µl    | 100 µl |

Mischen. Extinktionen sofort ablesen und Stoppuhr starten.  
 3 weitere Ablesungen in Abständen von genau 1 Minute durchführen und ΔE/min. bilden.

### Berechnung für Serumstart:

Für 1 cm Schichtdicke und Hg 405 nm gilt:  
 ΔE/min x 3298 = Aktivität (U/l)

### Messbereich:

Manuell bis 687U/l bzw. 11.5 µkat/l bei 37°C  
 Hitachi bis 2000U/l bzw. 33,3 µkat/l  
 Proben mit höheren Aktivitäten mit Rerun-Funktion bestimmen. Bei Geräten ohne Rerun Funktion die Proben 1+4 mit Natriumchlorid-Lösung (0.9%) verdünnen, die Bestimmung wiederholen und das Ergebnis mit 5 multiplizieren.

### Referenzbereich:

(nach Rosalki)

|        |        | 25°C  | 30°C  | 37°C  |
|--------|--------|-------|-------|-------|
| U/l    | Männer | <180  | <220  | <270  |
|        | Frauen | <160  | <195  | <240  |
| µkat/l | Männer | <3.00 | <3.67 | <4.50 |
|        | Frauen | <2.67 | <3.25 | <4.00 |

Referenzbereiche für Kinder bitte dem Buch „Pediatric reference ranges“3. Auflage. S.J. Soldin, C. Brugnara, I.M. Hicks AACC Press.

Jedes Labor sollte die Übertragbarkeit der Referenzbereiche für die eigenen Patientengruppen überprüfen und gegebenenfalls eigene Referenzbereiche ermitteln. Für diagnostische Zwecke sind die Ergebnisse der alkalischen Phosphatase stets im Zusammenhang mit der Anamnese, der klinischen Untersuchung und anderen Untersuchungsergebnissen zu werten.

### Impräzision:

Die Reproduzierbarkeit wurde mit Kontrollproben von Tag zu Tag (n = 20) bestimmt und ergab folgende Ergebnisse:

| Probe   | Tag / Tag |           |      |
|---------|-----------|-----------|------|
|         | MW<br>U/l | SD<br>U/l | % VK |
| Probe 1 | 143.1     | 2.3       | 1.59 |
| Probe 2 | 448.4     | 6.6       | 1.46 |
| Probe 3 | 449.2     | 5.9       | 1.32 |

### Methodenvergleich:

Bei einem Vergleich von Analyticon Fluitest® ALP DGKC (y) mit einem kommerziell erhältlichen Test (x) wurden mit 80 Proben folgende Ergebnisse ermittelt:

$$y = 0.992 x + 2.64; \quad r = 0.991$$

### Qualitätskontrolle:

Humanes Kontrollserum

|                  |           |       |
|------------------|-----------|-------|
| Contronorm® Plus | 5 x 5 ml  | #1205 |
|                  | 20 x 5 ml | #1220 |
| Contropath® Plus | 5 x 5 ml  | #1305 |
|                  | 20 x 5 ml | #1320 |

Die Kontrollintervalle und Kontrollgrenzen sind den individuellen Anforderungen jedes Labors und den länderspezifischen Richtlinien anzupassen. Die Ergebnisse müssen innerhalb der festgesetzten Bereiche liegen. Jedes Labor sollte Korrekturmaßnahmen für den Fall beschreiben, dass Werte außerhalb des Bereichs liegen.

### Kalibration:

S1: 0.9% NaCl

S2: Bio Cal® E                      10 x 3 ml                      #1430

### Kalibrationshäufigkeit:

Eine Zweipunktkalibration wird empfohlen bei

- Reagenzchargenwechsel
- wenn Qualitätskontrollverfahren dies erfordern

### Entsorgung:

Bitte beachten Sie die jeweiligen gesetzlichen Vorschriften.

### Literatur:

1. Bessey OAH et al. J Biol Chem 1946;164:321.
2. Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie. Standard-Methode zur Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase. Z klin Chem u klin Biochem 1972;10:191.
3. Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical Comparisons of Interferences in Clinical Chemistry Instrumentation. Clin Chem 1986;32:740-474
4. Greiling H, Gressner AM (Hrsg.). Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie, 3. Auflage. Stuttgart/New York: Schattauer Verlag, 1995.
5. Guder WG, Narayanan S, Wisser H, Zawta B. List of Analytes Preanalytical Variables. Broschüre in: Samples: From the Patient to the Laboratory. Darmstadt: GIT Verlag, 1996.
6. Hausamen TU et al. Clin Chim Acta 1967;15:241.
7. Rosalki SB, Foo AY, Burlina A et al. Multicenter Evaluation of Iso ALP Test Kit for Measurement of Bone Alkaline Phosphatase Activity in Serum and Plasma. Clin Chem 1993;39:648-652.

