

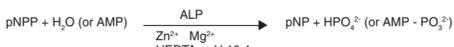


**Intended Use**

The IL Test™ Alkaline Phosphatase is intended for the quantitative *in vitro* diagnostic determination of alkaline phosphatase in human serum and plasma using the ILab Chemistry Systems. Increases in alkaline phosphatase can be a result of liver disease, bone disease and some carcinomas. Refer to the publication "Effects of Diseases on Clinical Laboratory Tests" for a summary of causes of increased and decreased alkaline phosphatase.<sup>1</sup>

**Principle/Test Summary**

Rate analysis. Based on the methodology first proposed by Bowers and McComb<sup>2,3</sup> using p-nitrophenylphosphate (pNPP) as the substrate and optimized by Tietz *et al.*<sup>4</sup> to include a metal ion buffer and a 2-amino-2-methyl-1-propanol (AMP) buffer. Conforms to IFCC recommendations.<sup>4</sup>



The rate of increase in absorbance due to production of p-nitrophenol (pNP) is directly proportional to sample alkaline phosphatase (ALP) activity.<sup>4</sup> Absorbance measurements are taken at 410 nm (ILab 900/1800) or 405 nm (ILab 600).

**Reactive Ingredients of Final Assay Mixture**

- p-nitrophenyl phosphate	16 mmol/L
- 2-amino-2-methyl-1-propanol	350 mmol/L
- Zn <sup>2+</sup>	1.0 mmol/L
- HEDTA	2.0 mmol/L
- Mg <sup>2+</sup>	2.0 mmol/L

**Precaution**

CAUTION: ALP SUBSTRATE AND ALP R1 REAGENTS CAN CAUSE IRRITATION. Avoid contact with eyes, skin and clothing. In case of contact, immediately flush eyes with plenty of water for at least 15 minutes. Call a physician. Flush skin with water.

CAUTION: ILab's waste stream contains approximately 0.02 mg of p-nitrophenol per test. Refer to specific Federal, State, & Local environmental regulations applicable to your establishment.

Handle all specimens as potentially infectious for HIV or Hepatitis B. Avoid contact with skin and eyes (S24/25). Do not empty into drains (S29). Wear suitable protective clothing (S36). This product is For *In vitro* Diagnostic Use.

**Reagent preparation**

Add the entire contents of a vial of ALP Substrate into a container of ALP R1. Reseal the ALP R1 container, invert to mix, and place into reagent tray (ILab 900/1800: place R1 into tray #1).

For smaller workload, use an empty vial and prepare the working reagent by mixing the two components proportionately i.e. 1 part ALP Substrate to 6.5 parts ALP R1.

**Storage of Unopened Reagents**

Refrigerate (2-8°C) until expired. See expiration date on carton.

**Working Reagent Storage and Stability**

7 days at 2-8°C and on board.

**Indicators of Reagent Deterioration**

**Physical appearance:** The working reagent should be pale yellow and clear. **Control Assay:** The proper range should be obtained during a controlled assay. **Absorbance Flange:** Changes in typical reagent blank absorbances may indicate reagent deterioration.

**Specimens**

Serum, lithium heparinized plasma. Analyze samples as soon as possible within 4 hours. Alkaline phosphatase activity increases slowly with storage. Increases of 5% to 10% after storage at 4°C for 24 hours are typical.<sup>4</sup>

**Calibration**

Enzyme activity is measured by the rate of production of a chromophore with well defined optical properties. The molar absorptivity constant of p-nitrophenol is 17.6 x 10<sup>4</sup> at 410 nm and 18.45 x 10<sup>4</sup> at 405 nm. Maintenance of optical properties, fluidics and thermal control is critical to the accuracy of this assay. The ILab continuously monitors fluidics, thermal control and some optical parameters. Automatic daily maintenance monitors additional optical properties. Maintenance procedures are detailed in the ILab Operator's manual. Any adjustments to the ILab should be immediately followed by performance of daily maintenance and quality control procedures. Any failures in the continuous monitoring, daily maintenance or quality control procedures indicate improper system performance. Reagent blanking should be performed daily or before patient assays if the reagent is used less frequently.

**Data Analysis**

The ILab calculates ALP activity as follows:

$$ACT_{\text{sample}} \text{ (U/L)} = EF \times \Delta A \quad EF = \frac{V_R}{V_S} \times \frac{1}{E} \times \frac{1}{PL} \times 10^6$$

Where:  
ACT = Activity  
EF = Enzyme factor  
V<sub>S</sub> = Total sample volume (mL)  
PL = Pathlength of cuvette (cm)  
ΔA = Change in absorbance per minute  
V<sub>R</sub> = Total reaction volume (mL)  
E = Molar absorptivity constant

\*The measurement in the ILab cuvette (0.5 cm for ILab 600 and 0.6 cm for ILab 900/1800) is automatically converted to 1 cm pathlength by the ILab.

$$\text{For ALP in ILab 900/1800: } EF = \frac{0.306}{0.006} \times \frac{1}{17.6 \times 10^4} \times \frac{1}{1} \times 10^6 = 2898$$

$$\text{For ALP in ILab 600: } EF = \frac{0.204}{0.004} \times \frac{1}{18.45 \times 10^4} \times \frac{1}{1} \times 10^6 = 2764$$

To convert U/L to nkat/L, multiply by 16.67.<sup>5</sup>

**Quality Control**

Use normal and abnormal controls in accordance with good laboratory practices. Analyze at least once per day. Use at least 2 levels of IL SeraChem<sup>®</sup> controls, such as SeraChem<sup>®</sup> Level 1 (Cat. No. 0018162412) and SeraChem<sup>®</sup> Level 2 (Cat. No. 0018162512). The target values and expected ranges can be found on the insert sheets. For identification and resolution of out-of-control situations, references such as Westgard *et al.*<sup>6</sup> are recommended.

**Interferences**

ILab 600: No interference from lipemia up to sample absorbance of 4.9/cm at 660 nm (1100 mg/dL triglycerides). No interference up to 125 mg/dL (0.075 mmol/L) hemoglobin. No interference up to 16 mg/dL (272 mmol/L) bilirubin.

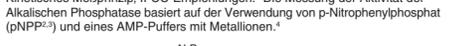
ILab 900/1800: No interference from lipemia up to sample absorbance of 3.0/cm at 660 nm. No interference up to 100 mg/dL (0.06 mmol/L) hemoglobin. No interference up to 20 mg/dL (340 mmol/L) bilirubin. For a comprehensive review of interfering substances, refer to the publication by Young.<sup>7</sup>

**Verwendung**

Zur quantitativen *in vitro* Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP) in Serum und Plasma mit dem ILab-Analysesystem. Die Bestimmung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität findet Verwendung in der Diagnose und Behandlung bestimmter Arten von Leber- und Knochenkrankungen und verschiedener Karzinome. Eine Übersicht der klinischen Bedeutung erhöhter Alkalischer Phosphatase-Aktivitäten wurde von Friedmann *et al.*<sup>1</sup> zusammengestellt.

**Testprinzip**

Kinetisches Maßprinzip, IFCC-Empfehlungen.<sup>4</sup> Die Messung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase basiert auf der Verwendung von p-Nitrophenylphosphat (pNPP<sup>2,3</sup>) und eines AMP-Puffers mit Metallionen.<sup>4</sup>



Die Absorptionszunahme aufgrund der Freisetzung von p-Nitrophenol ist proportional zur ALP-Aktivität in der Probe und wird mit Hilfe von Absorptionsmessungen bei 410 nm (ILab 900/1800) oder 405 nm (ILab 600) quantifiziert.<sup>4</sup>

**Aktive Bestandteile**

Endkonzentrationen im Test	
- p-Nitrophenylphosphat	16 mmol/L
- 2-Amino-2-Methyl-1-Propanol	350 mmol/L
- Zn <sup>2+</sup>	1,0 mmol/L
- HEDTA	2,0 mmol/L
- Mg <sup>2+</sup>	2,0 mmol/L

**Hinweis**

Reagenzien können Reizungen verursachen. Kontakt mit Augen, Haut oder Kleidung vermeiden. Bei Augenkontakt gründlich mit Wasser spülen und Arzt konsultieren. Bei Augenkontakt oder nach Verschlucken Arzt konsultieren. Achtung: Der flüssige Abfall des ILab enthält anteilig ca. 0,02 mg p-Nitrophenol/Teil. Bitte beachten Sie die jeweiligen Bundes-, Landes- und örtlichen Vorschriften zur Abfallbeseitigung.

Alle Proben wie potentiell infektiöses Material behandeln. Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden (S24/25). Nicht in die Kanalisation gelangen lassen (S 29). Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen (S36). Dieses Produkt ist nur für die *in vitro* Diagnostik geeignet.

**Herstellung der Arbeitslösung**

Den gesamten Inhalt eines Gefäßes ALP Substrate zum Inhalt eines ALP R1 Reagenzgefäßes zufügen und mischen. In die Reagenzstation stellen (ILab 900/1800: Nr. 1).

Bei geringen Testzahlen kann die Arbeitslösung durch Mischen der beiden Komponenten in einem leeren Reagenzgefäß unter Berücksichtigung des ursprünglichen Mischungsverhältnisses hergestellt werden: z.B. 1 Teil ALP Substrat + 6,5 Teile ALP R1.

**Lagerung und Haltbarkeit des ungeöffneten Reagenz**

Gekühlt lagern (2-8°C). Bei sachgemäßer Lagerung ist das Reagenz bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar.

**Lagerung und Haltbarkeit der Arbeitslösung**

Bei 2-15°C: 7 Tage.

**Anzeichen des Reagenzienzustandes**

**Optisches Bild:** Das Arbeitslösung soll hellgelb und klar sein. **Qualitätskontrolle:** Die Ergebnisse von Qualitätskontrollen müssen im jeweiligen Sollbereich liegen. **Absorptionsbereich:** Änderungen der typischen Absorption des Reagenzien-leerwertes geben Hinweis auf einen verschlechterten Reagenzienzustand. Um die optimale Analysenqualität sicherzustellen, wird empfohlen täglich oder bei selten benutzten Reagenzien unmittelbar vor jeder Analyse einen Reagenzienleerwert zu erstellen.

**Probenmaterial**

Serum und Plasma (Li-Heparinat). Die Bestimmungen sollten möglichst bald nach der Probenahme (innerhalb von 4 Stunden) erfolgen. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase in den Proben nimmt mit der Zeit zu (typischer Anstieg: 5 - 10% innerhalb von 24 Stunden bei 4°C).<sup>4</sup>

**Kalibration**

Diese Bestimmungsmethode muß nicht kalibriert werden, da im Reaktionsverlauf ein Chromophor mit definierten optischen Eigenschaften gebildet wird. Der Molare Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol bei 410 nm beträgt 17600 und bei 405 nm beträgt 18450. Es wird empfohlen, täglich oder bei selten benutzten Reagenzien unmittelbar vor der Analyse einen Reagenzienleerwert zu ermitteln.

**Berechnung**

Die Ergebnisse werden vom ILab-Analysesystem wie folgt berechnet:

$$\text{Enzymaktivität}_{\text{Probe}} \text{ (U/L)} = \Delta A \times EF$$

$$EF = \frac{V_R \times 10^6}{V_S \times E \times d}$$

ΔA: gemessene Absorptionsänderung pro Minute  
EF: Enzymfaktor  
V<sub>R</sub>: gesamtes Reaktionsvolumen (mL)  
V<sub>S</sub>: eingesetztes Probenvolumen (mL)  
E: Spezifischer Molare Absorptionskoeffizient  
d: Schichtdicke der Küvette (cm)  
\*Die Ergebnisse werden vom ILab-Analysesystem intern auf die verwendete Schichtdicke von 0,6 cm (ILab 900/1800) oder 0,5 cm (ILab 600) umgerechnet.

ILab 900/1800: Für diese Bestimmung der ALP-Aktivität gilt:

$$EF = \frac{0.306 \times 10^6}{0.006 \times 17600 \times 1} = 2898$$

$$\text{ILab 600: Für diese Bestimmung der ALP - Aktivität gilt:}$$

$$EF = \frac{0.204 \times 10^6}{0.004 \times 18450 \times 1} = 2764$$

Um von U/L auf nkat/L umzurechnen, ist mit Faktor 16,67 zu multiplizieren.<sup>5</sup>

**Qualitätskontrolle**

Es ist gängige Laborpraxis, die Qualität der Analyse mit Kontrollmaterialien verschiedener Konzentrationsstufen (normal und pathologisch) zu überprüfen. Spätestens nach jeweils 8 Stunden sollte eine Richtigkeitskontrolle durchgeführt werden. Es wird empfohlen, als Kontrollmaterial IL SeraChem<sup>®</sup> Level 1 (Best.- Nr. 0018162412) und SeraChem<sup>®</sup> Level 2 (Best.- Nr. 0018162512) zu verwenden. Sollwerte und Bereiche sind der jeweiligen Packungsbeilage zu entnehmen. Algorithmen zur Beurteilung der Qualitätskontrollergebnisse siehe z. B. Westgard *et al.*<sup>6</sup>

**Störungen**

ILab 600: Keine Störung durch Lipämie bis zu einer Probenabsorption von 4,9 / cm bei 660 nm (1100 mg/dL Triglyceride). Keine Störung durch Hämoglobin bis zu einer Probenkonzentration von 125 mg/dL (0,075 mmol/L). Keine Störung durch Bilirubin bis zu einer Probenkonzentration von 16 mg/dL (272 mmol/L).

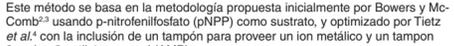
ILab 900/1800: Keine Störung durch Lipämie bis zu einer Probenabsorption von 3,0 / cm bei 660 nm. Keine Störung durch Hämoglobin bis zu einer Probenkonzentration von 100mg/dL (0,06 mmol/L). Keine Störung durch Bilirubin bis zu einer Probenkonzentration von 20 mg/dL (340 mmol/L). Eine umfassende Übersicht von möglichen Störfaktoren wurde von Young *et al.*<sup>7</sup> zusammengestellt.

**Usò Indicada**

IL Test™ Alkaline Phosphatase es para la determinación diagnóstica cuantitativa *in vitro* de fosfatasa alcalina en suero y plasma humano utilizando los analizadores de química clínica ILab. El incremento de fosfatasa alcalina es común en las enfermedades hepáticas, enfermedades óseas y algunos carcinomas. Referirse al artículo "Effects of Diseases on Clinical Laboratory Tests" para una recopilación de las causas de aumento o disminución de fosfatasa alcalina.

**Principio/Resumen**

Análisis cinético. Este método se basa en la metodología propuesta inicialmente por Bowers y McComb<sup>2,3</sup> usando p-nitrofenilfosfato (pNPP) como sustrato, y optimizado por Tietz *et al.*<sup>4</sup> con la inclusión de un tampón para proveer un ion metálico y un tampón 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP). La formulación del reactivo sigue las recomendaciones de IFCC.<sup>4</sup>



La velocidad de incremento de absorbancia debido a la producción de p-nitrofenol (pNP) es directamente proporcional a la actividad de fosfatasa alcalina en la muestra.<sup>4</sup> La absorbancia se mide a 410 nm (ILab 900/1800), a 405 nm (ILab 600).

**Componentes Activos en la mezcla de Ensayo**

- p-nitrofenilfosfato	16 mmol/L
- 2-amino-2-metil-1-propanol	350 mmol/L
- Zn <sup>2+</sup>	1,0 mmol/L
- HEDTA	2,0 mmol/L
- Mg <sup>2+</sup>	2,0 mmol/L

**Precauciones**

LOS REACTIVOS ALP R1 Y ALP Substrate PUEDEN CAUSAR IRRITACION. Evite el contacto con la piel, los ojos y los vestidos. En caso de contacto, lavar los ojos con agua abundante durante por lo menos 15 minutos. Consultarse un médico. Lavar la piel con agua. Los efuientes del ILab contienen aproximadamente 0,02mg de p-nitrofenol por ensayo. Debe consultarse las regulaciones ambientales locales aplicables a su establecimiento.

Trate las muestras como material potencialmente infectado por VIH o por Hepatitis B. Evite el contacto con los ojos y la piel (S 24/25). No tirar los residuos por el desagüe (S 29). Usen indumentaria protectora adecuada (S 36). Para uso diagnóstico *in vitro*.

**Preparación de los Reactivos**

Verter todo el contenido de un frasco de ALP Substrate en un contenedor de ALP R1. Cerrar el contenedor ALP R1, mezclar y colocar en el plato de reactivos (ILab 900/1800: plato No. 1).

Para una reducida carga de trabajo, preparar la solución de trabajo en una botella vacía rellena proporcionalmente los volúmenes de los dos componentes: 1 parte de ALP Substrate en 6,5 partes de ALP R1.

**Conservación de los Reactivos Sellados**

Refrigerar a 2-8°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

**Conservación y Estabilidad del Reactivo Preparado**

7 días en el instrumento y a 2-8°C.

**Indicadores de Deterioro del Reactivo**

**Aspecto físico:** El reactivo preparado debe ser límpido y de color amarillo pálido. **Rango del control:** El control debe dar un valor dentro del rango establecido. **Rango de absorbancia:** Variaciones en los valores típicos de absorbancia del ensayo en blanco pueden indicar deterioro del reactivo.

**Muestras**

Suero y plasma tratada con heparina lítica. Las muestras deben ser analizadas lo más rápidamente posible, y siempre dentro de las cuatro horas siguientes a la toma de muestra. La actividad de fosfatasa alcalina aumenta lentamente durante el almacenamiento, encontrándose incrementos de 5 a 10% luego de permanecer la muestra almacenada a 4°C durante 24 horas.<sup>4</sup>

**Calibración**

La actividad enzimática se mide en base a la velocidad de producción de un cromóforo que posee propiedades ópticas bien definidas. El coeficiente de extinción molar del p-nitrofenol es 17,6 x 10<sup>4</sup> a 410 nm y 18,45 x 10<sup>4</sup> a 405 nm. El control térmico y de flujos, y el mantenimiento de las propiedades ópticas son críticos para obtener la máxima exactitud en esta determinación. El ILab monitoriza constantemente los flujos, el control de temperatura y algunos parámetros ópticos. El mantenimiento automático diario monitoriza propiedades ópticas adicionales. Las tareas de mantenimiento se describen en detalle el manual del usuario. Todo ajuste que se realice sobre el ILab debe ser seguido inmediatamente por las tareas diarias de mantenimiento y control de calidad. Toda falla en los procedimientos de control de calidad y de mantenimiento diario resultará en el funcionamiento inadecuado del sistema. Se recomienda hacer un blanco de reactivo cada día de trabajo, o antes de analizar las muestras si el reactivo es usado menos frecuentemente.

**Cómputo de los Resultados**

La actividad ALP se calcula en el ILab como sigue:

$$ACT \text{ muestra (U/L)} = EF \times \Delta A$$

$$EF = \frac{V_R}{V_S} \times \frac{1}{E} \times \frac{1}{PL} \times 10^6$$

Donde:  
ACT = Actividad  
EF = Factor enzimático  
V<sub>R</sub> = Volumen total de reacción (mL)  
V<sub>S</sub> = Volumen total de muestra (mL)  
PL = Poso de la cubeta (cm)  
\*La media realizada en cubeta de 0,6 cm (ILab 900/1800) o de 0,5 cm (ILab 600) es automáticamente convertida a paso de cubeta de 1,0 cm por el ILab.

Para fosfatasa alcalina en el ILab 900/1800:

$$EF = \frac{0.306}{0.006} \times \frac{1}{17.6 \times 10^4} \times \frac{1}{1} \times 10^6 = 2898$$

Para fosfatasa alcalina en el ILab 600:

$$EF = \frac{0.204}{0.004} \times \frac{1}{18.45 \times 10^4} \times \frac{1}{1} \times 10^6 = 2764$$

La actividad se expresa en Unidades Internacionales /Litro (U/L).

Para convertir U/L a nkat/L, multiplicar por 16,67.<sup>5</sup>

**Control de Calidad**

Se recomienda el uso de controles normales y anormales en concordancia con las prácticas aceptadas de laboratorio. Comprobar el control al menos una vez cada día. Usense por lo menos dos niveles de controles IL SeraChem<sup>®</sup>, tales como SeraChem<sup>®</sup> Level 1 (Cat. No. 0018162412) y SeraChem<sup>®</sup> Level 2 (Cat. No. 0018162512). Ver los valores y los rangos esperados en los folletos adjuntos. Para la identificación y resolución de valores que estén fuera del rango de aceptación, se recomienda la consulta de la publicación de Westgard *et al.*<sup>6</sup>

**Reference Range**

Males: 53 - 128 U/L (888 - 2133 nkat/L).<sup>8</sup>  
Females: 42 - 141 U/L (700 - 2372 nkat/L).<sup>8</sup>

IL recommends that each laboratory establish its own reference range since ranges may vary with age, diet, gender, and geographical area.

**Precision**

The coefficient of variation (3 samples/run, 20 runs) for a sample with 61 U/L alkaline phosphatase should not be greater than 5% within run and 6% total. Typical precision results obtained according to NCCLS protocol<sup>9</sup>:

ILab 600	Samples/Runs	Mean (U/L)	CV (%)	Mean (U/L)	CV (%)
Within Run	3/20	43	3.7	187	1.3
Total	3/20	43	6.4	187	3.4

**Method Comparison**

Comparison Method (x)	ILab 600	ILab 900/1800
Comparison Method (x)	Same reagent	Same reagent
Comparison Instrument	ILab 900	Monarch 37°C
Slope	1.052	1.024
y Intercept	5.94	-0.57
Range (U/L)	24 - 623	30 - 544
Mean x (U/L)	89	157
Mean y (U/L)	99	160
r	0.999	0.999
SE	4.01	7.93
n	108	96

**Linearity**

ILab 600	no rerun	Linearity range (U/L)	Linearity range (nkat/L)
with rerun	10 - 850	10 - 4250	166 - 14170
ILab 900/1800	no rerun	10 - 850	166 - 14170
with rerun	10 - 1700	10 - 1700	166 - 28340

**Sensitivity**

mAbs change per min per U/L	ILab 600	ILab 900/1800
	0.36	0.34

**Minimum Detection Limit**

All ILab models: 2 U/L (33 nkat/L).



**Referenzbereich**

Männer: 53 - 128 U/L (888 - 2133 nkat/L).<sup>8</sup>  
Frauen: 42 - 141 U/L (700 - 2372 nkat/L).



<b>Doc. code:</b>	<b>Rev.</b>	<b>Doc. Type</b>	<b>CO N°</b>
100018252106	2	D17	AA1001331
<b>Title:</b>			
Artwork inserto ALKALINE PHOSPHATASE			
<b>Product</b>	<b>Product p/n</b>		
ALKALINE PHOSPHATASE	00018252140		
<b>Insert Sheet p/n:</b>	<b>Paper spec's</b>		
00018252106	White paper, 50-60 g/m <sup>2</sup> weight		
<b>DIMENSIONS</b>			
297 x 840 mm (11.7 x 33.07 inches)			
<b>COLORS PANTONE:</b>			
<input checked="" type="checkbox"/> BLACK	PER LA STAMPA IN QUADRICROMIA I PANTONI INDICATI SONO SOLO A SCOPO DI RIFERIMENTO.		
<input checked="" type="checkbox"/> GREEN 382			
<input type="checkbox"/> ORANGE 151			
<input type="checkbox"/> RED 032			
<input type="checkbox"/> BLUE 072			
<b>ATTENZIONE!</b> Materiale di proprietà della IL S.p.A. che non deve essere assolutamente modificato o danneggiato.			
 <b>Instrumentation Laboratory</b> Instrumentation Laboratory S.p.A. Viale Monza 338 - 20128 Milano Via 327a, 11 - Zona Industriale Campolungo - 63100 Ascoli Piceno (Italia)			