

**helena** | BioSciences  
Europe  
www.helena-biosciences.com

Helena BioSciences Europe  
Colima Avenue  
Sunderland Enterprise Park  
Sunderland  
SR5 3XB  
tel: +44 (0) 191 549 6064  
fax: +44 (0) 191 549 6271  
email: info@helena-biosciences.com

Other Helena BioSciences Europe offices:

Helena BioSciences Europe  
6 Rue Charles Cros-ZAE  
95320 Saint Leu La Foret  
France  
tel: +33 13 995 9292  
fax: +33 13 995 6891  
email: helena@helena.fr

Helena BioSciences Europe  
Via Enrico Fermi, 24  
20090 Assago (Milano)  
Italy  
tel: +39 02 488 1951  
or +39 02 488 2141  
fax: +39 02 488 2677



HL-2-1315P 2003.09 (8)

**helena** | BioSciences  
Europe  
www.helena-biosciences.com

**Instructions For Use**

**SAS-MX ALP Isoenzyme**  
Cat. No. 102000

SAS-MX Isoenzyme PAL  
Fiche technique  
Réf. 102000

SAS-MX AP-Isoenzym  
Anleitung  
Kat. Nr. 102000

Gel SAS-MX per isoenzima Alp  
Istruzioni per l'uso  
Cod. 102000

SAS-MX Isoenzimas Alp  
Instrucciones de uso  
N<sup>o</sup> de catálogo 102000

**Contents**

English .....	1
Français .....	7
Deutsch .....	14
Italiano .....	21
Español .....	28

## **SAS-MX ALP ISOENZYME**

### **INTENDED PURPOSE**

The SAS-MX ALP Isoenzyme kit is intended for the separation and quantitation of Alkaline Phosphatase Isoenzymes by agarose gel electrophoresis.

Alkaline Phosphatase (ALP) (EC 3.1.3.1) is an enzyme which catalyses the hydrolysis of phosphate esters at alkaline pH. The greatest concentrations of ALP are found in the liver, bone, intestine and placenta. However, practically every body tissue contains at least a small amount of ALP. Because of this wide distribution, the usefulness of a total ALP quantitation is limited. Fortunately, each source of ALP produces one predominant isoenzyme, and the tissue source of elevated ALP in serum can be determined by identifying the isoenzyme type.

The isoenzymes of ALP differ in their physicochemical and electrophoretic properties and, by taking advantage of these differences, the individual isoenzymes can be identified. In addition to the liver (including macrohepatic, or 'fast liver'), bone, intestinal and placental isoenzymes, other ALP isoenzymes have been identified in serum. These include Regan, Nagao, PA and renal isoenzymes.

The SAS-MX ALP Isoenzyme procedure is a high resolution electrophoresis method, utilizing differences in the response of the isoenzymes to neuraminidase<sup>2,3</sup> and a detergent in the gel to separate liver and macrohepatic (fast liver). The result is a separation capable of separating liver, bone, macrohepatic and intestinal ALP isoenzymes for use in the diagnosis and treatment of liver, bone, parathyroid and intestinal disorders. This system may separate the intestinal isoenzyme into 3 distinct bands - the clinical significance of these has not been determined.

### **WARNINGS AND PRECAUTIONS**

All reagents are for in-vitro diagnostic use only. Do not ingest or pipette by mouth any kit component. Wear gloves when handling all kit components. Refer to the product safety data sheet for risk and safety phrases and disposal information.

### **COMPOSITION**

#### **1. SAS-MX ALP Isoenzyme Gel**

Contains agarose in a Tris / Barbitol buffer with sodium azide and thiomersal as preservative. The gel is ready for use as packaged.

#### **2. Tris / Barbitol Buffer Concentrate**

Contains barbitol and sodium barbitol with sodium azide as preservative. Dilute the contents of the bottle to 1 litre with purified water and mix well. Buffer salts may crystallize slightly on standing. Wash any crystals from the bottle with diluted buffer to ensure complete dissolution.

#### **3. SAS-MX ALP Separation Enhancer**

Contains neuraminidase from *Vibrio Cholerae* (EC 3.2.1.18). The separation enhancer is ready for use as packaged.

#### **4. SAS-MX ALP Isoenzyme Substrate**

Contains BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) in 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol buffer. The isoenzyme substrate is ready for use as packaged.

#### **5. SAS-MX ALP Isoenzyme Chromagen**

Contains NBT (nitroblue tetrazolium) powder. See STEP-BY-STEP PROCEDURE for reconstitution instructions.

#### **6. Other Kit Components**

Each kit contains Instructions For Use, sufficient Sample Application Templates, Blotters A, B, C, D and Wicks to complete 10 gels.

**STORAGE AND SHELF-LIFE****1. SAS-MX Alkaline Phosphatase Gel**

Gels should be stored at 15...30°C and are stable until the expiry date indicated on the package. DO NOT REFRIGERATE OR FREEZE THE PLATES. Deterioration of the gel may be indicated by 1) crystalline appearance indicating the gel has been frozen, 2) cracking and peeling indicating drying of the gel or 3) visible contamination of the agarose from bacterial or fungal sources.

**2. Tris / Barbital Buffer**

The buffer concentrate should be stored at 15...30°C and is stable until the expiry date indicated on the label. Diluted buffer is stable for 2 months at 15...30°C. Cloudiness or poor performance of the diluted buffer may indicate deterioration.

**3. SAS-MX ALP Isoenzyme Separation Enhancer**

The separation enhancer should be stored at 2...6°C and is stable until the expiry date indicated on the label. Cloudiness or poor performance may indicate deterioration.

**4. Alkaline Phosphatase Substrate**

The alkaline phosphatase substrate should be stored at 2...6°C and is stable until the expiry date indicated on the label. Discolouration or poor performance may indicate deterioration.

**5. Alkaline Phosphatase Chromagen**

The alkaline phosphatase chromagen should be stored at 2...6°C and is stable until the expiry date indicated on the label. Avoid contamination. Reconstituted chromagen should be used within 30 minutes of preparation.

**ITEMS REQUIRED BUT NOT PROVIDED**

Cat. No. 4063 SAS-MX Chamber

Cat. No. 1525 EPS600 Power Supply

Cat. No. 3039 Chamber Cooling Device

Cat. No. 5014 Development Weight

Cat. No. 4062 Incubation chamber

Drying Oven with forced air capable of 60...70°C

Incubator capable of 45°C

Glass plate

Vortex

Destain solution: Mix 100ml of glacial acetic acid and 900ml of purified water. Store in a tightly stoppered bottle.

Purified water

**SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION**

Freshly collected serum is the specimen of choice. Serum should be removed from the red cells as soon as possible after blood collection. Samples containing oxalate, citrate or EDTA cannot be used as these substances inhibit alkaline phosphatase activity<sup>4</sup>. Total ALP level should be determined by an appropriate method.

Patients should be fasting. Patients with blood groups O or B who are secretors may have an elevated Intestinal ALP around 2 hours after a fatty meal<sup>5,6</sup>.

It is recommended that serum be tested as soon as possible after collection and that the serum should be stored at 2...6°C. If necessary, the serum should be stored frozen at -20°C for no more than 24 hours<sup>7,8</sup>.

**SAS-MX ALP ISOENZYME**

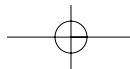
**Interfering Factors:** 1) Phosphate, oxalate, citrate and cyanide can inhibit ALP activity<sup>4,8</sup>. 2) Excess glycine may inhibit ALP by complexing Magnesium ions, 3) EDTA can inhibit some ALP isoenzymes<sup>4</sup>, 4) Several drugs cause an enzymatic imbalance which may affect ALP level<sup>9</sup>.

Samples with high total ALP activity can be diluted if the high activity affects the ability to discriminate between isoenzyme types. **NOTE:** Dilutions should not be performed in saline or water, as the migration of the isoenzymes will be affected. Dilutions should be performed in serum from a male donor which has been heat treated (56°C for 15-20 minutes) to destroy endogenous ALP activity. The suitability of the serum for use as a diluent should be checked before use.

**STEP-BY-STEP PROCEDURE**

**NOTE:** Ensure that the Chamber Cooling Device has been stored at 2...6°C for at least 60 minutes prior to use.

- To every 25µl of sample / control add 5µl of separation enhancer and incubate at 15...30°C for 5 minutes. **NOTE:** For optimal separation it is important to keep to the times stated.
- Remove the gel from the packaging and place on a paper towel. Blot the gel surface with a blotter C, discard blotter.
- Align the sample application template with the arrows at the edge of the gel. Place a blotter A on top of the template and rub a finger across the slits to ensure good contact. Remove the blotter and retain for use in Step 6.
- Apply 5µl of sample to each slit and allow to absorb for 10 minutes.
- Whilst the sample is absorbing, pour 100ml of buffer into each outer section of the SAS-MX Chamber. Place the chamber cooling device into the central trough of the chamber and wet the surface with a few drops of buffer.
- Following sample absorption, blot the template with the blotter A retained from step 3 and remove both blotter and template.
- Position the gel on top of the cooling device agarose side up, aligning the positive (+) and negative (-) sides with the corresponding positions on the chamber. Take care to avoid trapped air bubbles under the gel.
- Prepare a wick for each side of the gel by placing 3 wicks together in 2 sets, to make 2 thick wicks. Immerse each wick in the buffer, gently squeeze out excess buffer and attach each wick to the edge of the gel, parallel with the edge of the cooling device. Ensure one edge of the wick is immersed in the buffer and rub one finger across the portion of the wick on the gel to ensure good contact.
- Electrophorese the gel: 250 volts, 30 minutes.
- Whilst the samples are electrophoresing, place a tissue moistened with water into the incubation chamber and place in the incubator set at 45°C to equilibrate.
- Approximately 10 minutes before the end of electrophoresis, reconstitute 1 vial of ALP isoenzyme chromagen by adding 1ml of ALP substrate. Vortex mix for 30 seconds and allow to stand undisturbed until use.
- Following electrophoresis, place the gel agarose side up, onto the glass plate. Pour the contents of the ALP isoenzyme vial along one edge of the gel.
- Using a serological pipette, spread the reagent across the gel surface. Wait 15 seconds and repeat spreading, wait 15 seconds and roll the excess off the gel.
- Place the gel in the incubation chamber. Incubate the gel: 30 minutes, 45°C.
- Wash the gel in destain solution for 5 minutes.



## SAS-MX ALP ISOENZYME

16. Place the gel on a blotter D agarose side up, and place a blotter B (wetted in destain solution) onto the surface of the gel followed by 2 blotter D. Press the gel for 5 minutes using the development weight.
17. Remove the weight and blotters and rinse the gel in purified water.
18. Dry the gel at 60...70°C.

### INTERPRETATION OF RESULTS.

#### 1. Qualitative Evaluation:

The gels may be visually inspected for the presence or absence of particular bands of interest.

#### 2. Quantitative Evaluation:

Scan the SAS-MX ALP Isoenzyme gels (gel side down) within 2 hours of completion at 595nm.

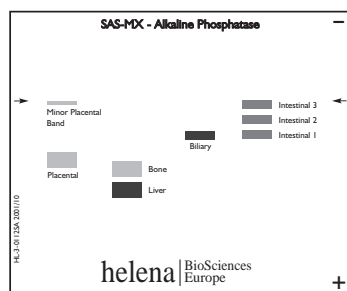
In either case, an increase or decrease in particular serum components or the detection of unusual serum components require investigation. The completed SAS-MX ALP Isoenzyme gel should be stored in the dark to prevent increased background colouration.

Interpretation of ALP isoenzyme patterns should not be attempted without knowledge of the total ALP level in the patient's serum. Serum from normal individuals may contain small amounts of liver, bone and intestinal ALP<sup>8,10,11</sup>. ALP levels are age and sex dependant<sup>8,12,13</sup>.

Pregnant females may show a placental band. The macrohepatic (fast liver) band seen in neoplasms should be interpreted as an alert to a disease state regardless of total ALP level.

The performance of the rare Nagao, Regan and PA isoenzymes with this system are not known at this time. Abnormal bands have been reported in patients with normal total ALP levels.

Figure 1 (below) shows a diagrammatic representation of the migration characteristics of the main ALP Isoenzyme bands.



The liver band migrates the most anodic of all the bands. The liver band on patients with a high total ALP will migrate more anodal than that on a normal level patient. Liver is the enzyme most frequently elevated when total ALP levels are elevated<sup>6,10</sup>. The liver ALP increases early in liver disease before most other liver function tests show abnormalities. The wide group of conditions leading to increased liver ALP include acute hepatitis, cirrhosis, fatty liver, drug induced liver disease, obstruction of biliary flow by carcinoma at the head of the pancreas, bile duct stricture, primary biliary cirrhosis and metastatic carcinoma of the liver<sup>9</sup>.

Next to the liver band, running more cathodal is the bone band. In samples containing high activities of the bone isoenzyme, the bone band runs more slowly than that of a normal patient. The bone band often has a characteristic square shape, as opposed to the more normal oblong shape of the electrophoretic bands. Bone isoenzyme is increased as a results of increased osteoblast activity. This isoenzyme is normally elevated in growing children and adults over the age of 50. The highest total ALP values have been attributed to increased bone isoenzyme in Paget's disease or renal rickets<sup>14</sup>. An abnormally high bone isoenzyme level may also be indicative of bone cancer, osteomalacia or celiac sprue<sup>5</sup>. A decreased bone ALP in children may be attributed to cretinism or hypophosphatasia.

Running cathodal to the bone band is the macrohepatic (fast liver) band. Macrohepatic ALP has been isolated in cases of metastatic carcinoma to the liver and has been suggested as a diagnostic tool in identifying such cases. It has also been isolated in patients with viral hepatitis, alcoholic cirrhosis and other liver diseases. Data generated by Viot and associates<sup>15</sup> suggest that macrohepatic ALP is highly correlated with the presence of liver metastases and that the presence of this isoenzyme could be predictive of the appearance of liver metastases. Viot also reports that macrohepatic ALP is seen occasionally in patients free of any disease state<sup>15</sup>.

The intestinal ALP isoenzyme band(s) run cathodal to the macrohepatic. The appearance of up to three bands is more common in samples from non-fasting patients.

The identification of ALP isoenzymes such as Regan, Nagao and PA may require the use of additional testing protocols such as heat inactivation<sup>16</sup>, amino acid inhibition<sup>17,18</sup>, urea denaturation<sup>17,18</sup> or separation on polyacrylamide gels<sup>20,21</sup>.

### QUALITY CONTROL

Alkaline Phosphatase Isoenzyme Control (Cat. No. 3059) contains normal levels of Liver and Bone isoenzymes and can be used to verify all phases of the procedure and should be used on each plate run. Refer to the package inserts for acceptable assay values.

### REFERENCE VALUES

It is recommended that any evaluation of the gels is performed against normal values which have been produced for this test in each individual laboratory.

An indication of normal ALP Isoenzymes can be found in Rhone, *et al*<sup>8</sup>, Fritsche *et al*<sup>10</sup> and Lee *et al*<sup>11</sup>.

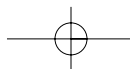
### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

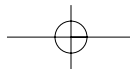
#### Reproducibility

	Within-Run (n=15)		Between-Run (n=75)	
	Mean	CV (%)	Mean	CV (%)
Liver	51.8%	3.4	51.8%	4.5
Bone	48.3%	3.6	48.2%	4.8

#### Sensitivity

The method is sensitive to 51 +/- 5.7IU per band, determined as the lowest concentration of ALP isoenzyme which is evident as a discrete band on the completed gel.



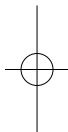


### Linearity

The linearity of the method is a function of densitometer specification as well as gel performance. It is recommended that each customer determine the linearity of the method based upon the densitometer in use in the laboratory.

### BIBLIOGRAPHY

1. Fishman, W.H. Am. J. Med., 1974; 56 : 617-650.
2. Moss, D.W. and Edwards, R.K. Clin. Chim. Acta, 1984; 143 : 177-182.
3. Moss, D.W. et al. Biochem. J., 1966; 98 : 32C-33C
4. Young, D.S. et al., 'Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests', 3rd Ed., AACC Press, Washington D.C., 1990.
5. Sundblad, L. et al Clin. Chim. Acta, 1973; 45 : 219-223.
6. Rhone, D.P. et al., Clin. Chem., 1973; 19(10) : 1142-1147.
7. Massion, C.G. and Frankenfeld, J.K., Clin. Chem., 1972; 18(4) : 366-373.
8. Wolf, P.L., Arch. Pathol. Lab. Med., 1978; 102 : 497-501.
9. Ahmad, I., Clin. Chem., 1978; 24(10) : 1850-1851.
10. Fritsche, H.A. and Adams-Park, H.R., Clin. Chem., 1972; 18(5) : 417-421.
11. Lee, L.M. and Kenny, M.A., Clin. Chem., 1975; 21(8) : 1128-1135.
12. Eastman, J.R. and Bixler, D., Clin. Chem., 1977; 23(9) : 1769-1770.
13. Cherian, A.G. and Hill, J.G., Am. J. Clin. Pathol., 1978; 70(5) : 783-789.
14. Nerenburg, S.T. 'Medical Technology', Lea and Febiger Inc., Philadelphia, 122-123, 1973.
15. Viot, M. et al., Biomedicine, 1979; 31 : 74-77.
16. Posen, S. et al., Ann. Int. Med., 1965; 62(6) : 1234-1243.
17. Stepan, J. and Vecerek, B., Acta Univ. Carol., 1977; Mono 77 : 135-140.
18. O'Carroll, D. et al., Am. J. Clin. Pathol., 1975; 63 : 564-572.
19. Rhone, D.P. and Mizuno, F.M., Am. J. Clin. Pathol., 1973; 59 : 531-541.
20. Johnson, R.B. et al., Clin. Chem., 1972; 18(2) : 110-115.
21. Rosalki, S.B. and Foo, A.Y., Clin. Chem., 1985; 31(7) : 1198-2000.



## SAS-MX ISOENZYMES PAL

### UTILISATION

Le kit SAS-MX Isoenzyme PAL est destiné à la séparation et à la quantification des isoenzymes de la phosphatase alcaline par électrophorèse en gel d'agarose.

La phosphatase alcaline (PAL) (EC 3.1.3.1) est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse des esters de phosphate à un pH alcalin.

La plus forte concentration de PAL est retrouvée dans le foie, les os, les intestins et le placenta. Toutefois, pratiquement tous les tissus du corps contiennent au moins une faible quantité de PAL. Du fait de cette large distribution, l'utilité du dosage de la PAL totale est limitée. Par chance, chaque source de PAL produit une isoenzyme prédominante, ce qui fait qu'il est possible d'identifier le tissu source de production élevé de PAL grâce au type d'isoenzyme.

Les isoenzymes de la PAL diffèrent par leurs propriétés physico-chimiques et leurs mobilités électrophorétiques, si bien que ces différences permettent d'identifier les isoenzymes spécifiques. En plus des isoenzymes hépatique (incluant la macrohépatique ou "foie rapide"), osseuse, intestinale et placentaire, d'autres isoenzymes ont été identifiées dans le sérum. Il s'agit des isoenzymes Regan, Nagao, PA et rénales.

Le kit SAS-MX Isoenzyme PAL est une méthode électrophorétique à haute résolution qui se sert de la réponse différentielle des isoenzymes à la neuraminidase<sup>2,3</sup> et d'un détergent dans le gel pour séparer la fraction hépatique de la fraction macrohépatique (foie rapide). Le résultat est une séparation qui permet de différencier les isoenzymes de la PAL hépatique, osseuse, macrohépatique et intestinale et qui est utilisée dans le diagnostic et le traitement des troubles hépatiques, osseux, parathyroïdiens et intestinaux. Ce système permet de séparer l'isoenzyme intestinale en 3 fractions distinctes dont la signification clinique n'a pas été déterminée.

### PRÉCAUTIONS

Tous les réactifs sont à usage diagnostique in-vitro uniquement. Ne pas ingérer ou pipeter à la bouche aucun composant. Porter des gants pour la manipulation de tous les composants. Se reporter aux fiches de sécurité des composants du kit pour la manipulation et l'élimination.

### COMPOSITION

#### 1. Plaque SAS-MX Isoenzyme PAL

Contient de l'agarose dans un tampon Tris / Barbitol additionné de thimérol et d'azide de sodium comme conservateurs. Le gel est prêt à l'emploi.

#### 2. Tampon concentré Tris / Barbitol

Contient du barbitol et du barbitol sodique avec de l'azide de sodium comme conservateur. Diluer le contenu du flacon dans 1 litre d'eau distillée et bien mélanger. Il est possible que les sels du tampon cristallisent. Rincez ces cristaux avec le tampon dilué afin d'assurer une dissolution complète.

#### 3. Séparateur SAS-MX Isoenzyme PAL

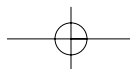
Contient de la neuraminidase extraite de *Vibrio Cholerae* (EC 3.2.1.18). Le séparateur est prêt à l'emploi.

#### 4. Substrat SAS-MX Isoenzyme PAL

Contient du BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) dans un tampon 2-amino-2-méthyl-1,3-propanediol. Le substrat d'isoenzyme est prêt à l'emploi.

#### 5. Chromogène SAS-MX Isoenzyme PAL

Contient du NBT (nitrobleu de tétrazolium) en poudre. La section MÉTHODOLOGIE fournit les instructions nécessaires à la reconstitution.



**6. Autres composants du kit**

Chaque kit contient également une fiche technique, des buvards A, B, C et D, des masques applicateur échantillons (Template) et des ponts papier pour 10 gels.

**STOCKAGE ET CONSERVATION****1. Plaque SAS-MX Isoenzyme PAL**

Les gels doivent être conservés entre 15...30°C; ils sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage. **NE PAS REFRIGERER OU CONGELER.** Les conditions suivantes indiquent une détérioration du gel: 1) des cristaux visibles indiquant que le gel a été congelé, 2) des craquelures indiquant une déshydratation du gel, 3) une contamination visible, bactérienne ou fongique.

**2. Tampon Tris / Barbitol**

Le tampon concentré doit être conservé entre 15...30°C; il est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Après reconstitution, le tampon est stable 2 mois entre 15...30°C. Un aspect floconneux ou une perte de performance indique une détérioration du tampon reconstitué.

**3. Séparateur SAS-MX Isoenzyme PAL**

Le séparateur doit être conservé entre 2...6°C; il est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Un aspect floconneux ou une perte de performance indique une détérioration du produit.

**4. Substrat SAS-MX Isoenzyme PAL**

Le substrat de la phosphatase alcaline doit être conservé entre 2...6°C; il est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Un changement de couleur ou une perte de performance indique une détérioration du produit.

**5. Chromogène SAS-MX Isoenzyme PAL**

Le chromogène de la phosphatase alcaline doit être conservé entre 2...6°C; il est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Éviter toute contamination. Le chromogène reconstitué doit être utilisé dans les 30 minutes suivant la préparation.

**MATÉRIELS NÉCESSAIRES NON FOURNIS**

Réf. 4063 Chambre de migration SAS-MX

Réf. 1525 Générateur EPS600

Réf. 3039 Élément réfrigérant (Cooling Device)

Réf. 5014 Poids à développement

Réf. 4062 Chambre d'incubation

Étuve de séchage à convection forcée offrant une température entre 60...70°C

Incubateur offrant une température de 45°C

Plaque de verre

Vortex

Solution décolorante: Mélanger 100ml d'acide acétique glacial avec 900ml d'eau distillée. Conserver en bouteille hermétiquement fermée.

Eau distillée

**SAS-MX ISOENZYME PAL****PRÉLÈVEMENTS DES ÉCHANTILLONS**

L'utilisation de sérums fraîchement prélevés est fortement recommandée. Les échantillons doivent être décantés immédiatement après le prélèvement. Les échantillons contenant de l'oxalate, du citrate ou de l'EDTA ne doivent pas être utilisés car ces substances inhibent l'activité phosphatase. Le taux de PAL total peut être déterminé par une méthode appropriée.

Le patient doit être à jeun. Les patients de groupe sanguin O ou B peuvent avoir une phosphatase alcaline intestinale élevée environ 2 heures après un repas gras<sup>4,6</sup>. Il est recommandé de travailler le plus rapidement possible sur le sérum après le prélèvement et celui-ci doit être conservé entre 2...6°C. Si nécessaire, le sérum peut être conservé 24 heures à -20°C<sup>7,8</sup>.

**Facteurs interférents:** 1) Le phosphate, l'oxalate, le citrate et le cyanure inhibent l'activité phosphatase<sup>4,6</sup>. 2) Un excès de glycine peut inhiber la PAL en complexant les ions magnésium. 3) L'EDTA peut inhiber certaines isoenzymes de la PAL<sup>4</sup>. 4) Certains médicaments créent un déséquilibre enzymatique qui peut changer la concentration des isoenzymes<sup>4,9</sup>.

Les échantillons avec un taux élevé d'activité PAL total peuvent être dilués si la forte activité affecte la différenciation des types d'isoenzymes. **REMARQUE:** Les dilutions ne doivent pas être effectuées en solution physiologique ou en eau distillée car la migration des isoenzymes en serait affectée. Les dilutions doivent être réalisées à l'aide de sérum provenant d'un donneur masculin et ayant subi un traitement thermique (56°C pendant 15-20 minutes) afin de détruire l'activité PAL endogène. Il est nécessaire de vérifier qu'il est possible d'employer comme diluant ce sérum avant de l'utiliser.

**MÉTHODOLOGIE**

**REMARQUE:** S'assurer que l'élément réfrigérant (Cooling Device) a été réfrigéré entre 2...6°C pendant au moins 60 minutes avant de l'utiliser.

1. Pour 25µl d'échantillon / de contrôle, ajouter 5µl de séparateur et incubé 5 minutes entre 15...30°C. **REMARQUE:** Pour obtenir une séparation optimale, il est important de respecter la durée indiquée.
2. Sortir le gel de son emballage et le déposer sur un papier absorbant. Sécher la surface du gel à l'aide d'un buvard C, jeter le buvard.
3. Disposer le masque applicateur échantillon en faisant correspondre les flèches avec les 2 fentes latérales. Placer un buvard A sur le masque et passer délicatement le doigt sur les fentes afin d'assurer un contact optimal. Retirer le buvard A et le conserver pour l'étape 6.
4. Déposer 5µl d'échantillon traité sur chaque fente et laisser absorber 10 minutes.
5. Pendant ce temps, verser 100ml de tampon dans chaque compartiment extérieur de la chambre de migration SAS-MX. Placer l'élément réfrigérant dans la partie centrale de la chambre de migration et humidifier la surface de celui-ci à l'aide de quelques gouttes de tampon.
6. Une fois l'absorption de l'échantillon terminée, sécher le masque applicateur avec le buvard A conservé à l'étape 3 puis enlever le buvard et le masque applicateur.
7. Déposer le gel, agarose vers le haut, sur la surface de l'élément réfrigérant, en respectant les polarités. Veiller à ce qu'il n'y ait pas de bulles d'air sous le gel.
8. Préparer les ponts de papier en joignant 3 ponts de papier fins pour chaque côté. Plonger chaque groupe de ponts de papier dans le tampon de migration, éliminer l'excès de tampon et placer ceux-ci sur le bord du gel, parallèlement à l'élément réfrigérant. S'assurer qu'une extrémité du pont trempé dans le tampon de migration et appuyer légèrement sur l'autre avec le doigt afin d'optimiser le contact avec le gel.
9. Faire migrer à 250 volts pendant 30 minutes.

10. Pendant que la migration a lieu, placer un papier absorbant humidifié avec de l'eau dans la chambre d'incubation et la régler à 45°C pour qu'elle s'équilibre.
11. Environ 10 minutes avant la fin de la migration, reconstituer 1 flacon de chromatogène Isoenzyme PAL en ajoutant 1ml de substrat PAL. Vortexer pendant 30 secondes et laisser reposer jusqu'à utilisation.
12. Une fois l'électrophorèse terminée, placer le gel, agarose vers le haut, sur la plaque de verre. Verser le contenu du flacon de chromogène Isoenzyme PAL d'un côté du gel.
13. Étaler à l'aide d'une pipette sérologique le réactif sur le gel. Attendre 15 secondes puis répéter l'étalement; attendre 15 secondes puis enlever l'excès.
14. Placer le gel dans la chambre d'incubation. Incuber le gel pendant 30 minutes à 45°C.
15. Laver le gel dans la solution décolorante pendant 5 minutes.
16. Placer le gel, agarose vers le haut, sur un buvard D et déposer dessus un buvard B (imbibé de solution décolorante) puis deux buvards D. Presser le gel à l'aide d'un poids à développement pendant 5 minutes.
17. Enlever le poids et les buvards puis rincer le gel avec de l'eau distillée.
18. Sécher le gel entre 60...70°C.

#### INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

##### 1. Évaluation qualitative:

Une lecture visuelle des plaques permet de déterminer si les bandes d'une isoenzyme spécifique sont présentes ou non.

##### 2. Évaluation quantitative:

Lire la plaque de gel (agarose vers le bas) dans les 2 heures à 595nm.

Dans tous les cas, une élévation ou une diminution d'un composant particulier du sérum ou la détection d'un composant inhabituel doit conduire à d'autres investigations. Le gel SAS-MX Isoenzyme PAL doit être conservé à l'abri de la lumière afin d'éviter l'apparition d'un fond de bande.

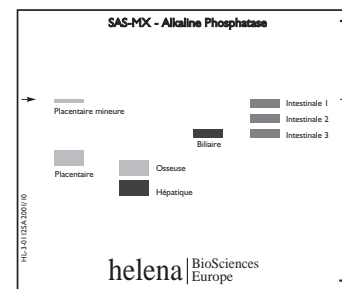
L'interprétation des isoenzymes de la PAL ne doit pas se faire sans le taux de PAL total sérique du patient. Le sérum d'un individu normal peut contenir une faible quantité d'isoenzyme hépatique, osseuse et intestinale<sup>6,10,11</sup>. Les taux de PAL dépendent de l'âge et du sexe<sup>8,12,13</sup>.

La femme enceinte peut présenter une bande placentaire. La présence de fraction macrohépatique (ou foie rapide) doit être considérée comme un facteur d'alerte d'un état malade quel que soit le taux de PAL total.

La performance de ce système avec les isoenzymes rares Reagan, Nagao et PA n'est pas connue à ce jour. Des bandes anormales ont été retrouvées chez des patients avec un taux de PAL total normal.

#### SAS-MX ISOENZYME PAL

La figure 1 (ci-dessous) est une représentation des caractéristiques de migration des principales isoenzymes de la PAL.



La fraction hépatique migre de façon anodique par rapport à toutes les autres. Chez un patient avec un taux élevé de PAL total, cette fraction hépatique migre de façon encore plus anodique que chez un patient avec un taux de PAL normal. La fraction hépatique est l'enzyme la plus fréquemment élevée lorsque le taux de PAL est lui aussi élevé<sup>6,10</sup>. En cas de maladies hépatiques, elle augmente avant que les autres paramètres hépatiques ne présentent des anomalies. Les pathologies suivantes entraînent une augmentation de la fraction hépatique: hépatite aiguë, cirrhose, stéatose hépatique, hépatite médicamenteuse ou toxique, lithiase des voies biliaires par cancer de la tête du pancréas, sténose biliaire, cirrhose biliaire primitive et métastase hépatique.

La fraction osseuse se trouve au-dessus de la fraction hépatique, migrant de façon plus cathodique. Dans un échantillon contenant une forte activité en fraction osseuse, celle-ci migre plus lentement que la fraction osseuse d'un patient normal. Elle se caractérise souvent par une fraction carrée en opposition à la forme ovale des bandes d'électrophorèse. L'isoenzyme osseuse est augmentée lors d'un accroissement de l'activité des ostéoblastes. Cette fraction est normalement élevée chez les enfants en pleine croissance et chez les adultes au-delà de 50 ans. L'augmentation du taux de PAL total est attribué à l'isoenzyme osseuse dans la maladie de Paget et le rachitisme rénal<sup>14</sup>. Un taux élevé d'isoenzyme osseuse peut aussi indiquer un cancer des os, une ostéomalacie ou une maladie coéliqua<sup>8</sup>. Une diminution de la fraction osseuse chez un enfant peut être attribuée au crétinisme ou à une hypophosphatasie.

La fraction macrohépatique (foie rapide) migre de façon plus cathodique par rapport à la fraction osseuse. La fraction macrohépatique a été isolée dans les cas de métastases hépatiques, elle peut donc être utilisée comme outil pour le diagnostic pour identifier ces pathologies. Elle a aussi été retrouvée chez des patients ayant une hépatite virale, une cirrhose alcoolique ou d'autres maladies hépatiques. Les données fournies par Viot et al.<sup>15</sup> suggèrent que la fraction macrohépatique est hautement corrélée avec la présence de métastases hépatiques et que la détection de cette fraction est prédictive de l'apparition de métastases hépatiques. Viot signale aussi que la fraction macrohépatique a été occasionnellement retrouvée chez des patients sains<sup>15</sup>.

**SAS-MX ISOENZYMES PAL**

La fraction intestinale migre de façon plus cathodique que la fraction macrohépatique. Les trois bandes sont fréquemment rencontrées dans les échantillons des patients non à jeun.

L'identification des isoenzymes Regan, Nagao et PA demande un protocole supplémentaire comme l'inactivation par la chaleur<sup>16</sup>, l'inhibition par acide aminé<sup>17,19</sup>, la dénaturation par l'urée<sup>17,18</sup> ou la séparation en gel de polyacrylamide<sup>20,21</sup>.

**CONTRÔLE QUALITÉ**

Le contrôle Isoenzyme phosphatase alcaline (réf. 3059) contient un taux normal d'isoenzymes hépatique et osseuse et peut être utilisé pour vérifier toutes les étapes de la technique et doit être déposé sur chaque plaque. Se reporter à la notice pour la vérification des valeurs.

**VALEURS DE RÉFÉRENCE**

Il est recommandé de réaliser chaque évaluation en comparant les gels à un modèle normal obtenu dans les mêmes conditions pour chaque laboratoire.

La bibliographie fournit une indication des valeurs normales : Rhone *et al.*<sup>4</sup>, Fritsche *et al.*<sup>10</sup> et Lee *et al.*<sup>11</sup>.

**PERFORMANCES****Reproductibilité**

	Intra-plaque (n=15)		Inter-plaque (n=75)	
	Moyenne (%)	CV (%)	Moyenne (%)	CV (%)
Hépatique	51.8%	3.4	51.8%	4.5
Osseuse	48.3%	3.6	48.2%	4.8

**Sensibilité**

La méthode est sensible à partir de 51 +/- 5.7IU par bande, concentration la plus faible en isoenzymes de la PAL permettant la mise en évidence d'une fine bande après coloration.

**Linéarité**

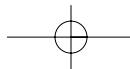
La linéarité est fonction des caractéristiques du densitomètre ainsi que des performances du gel. Il est recommandé à chaque client de déterminer la linéarité de cette méthode en fonction du densitomètre utilisé au sein du laboratoire.

**BIBLIOGRAPHIE**

1. Fishman, W. H., Am. J. Med., 1974 ; 56 : 617-650.
2. Moss, D. W. et Edwards, R. K., Clin. Chim. Acta, 1984 ; 143 : 177-182.
3. Moss, D. W. et al., Biochem. J., 1966 ; 98 : 32C-33C
4. Young, D. S. et al., 'Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests', 3<sup>e</sup> éd., AACC Press, Washington D.C., 1990.
5. Sundblad, L. et al., Clin. Chim. Acta, 1973 ; 45 : 219-223.
6. Rhone, D. P. et al., Clin. Chem., 1973 ; 19(10) : 1142-1147.
7. Massion, C. G. et Frankenfeld, J. K., Clin. Chem., 1972 ; 18(4) : 366-373.
8. Wolf, P. L., Arch. Pathol. Lab. Med., 1978 ; 102 : 497-501.
9. Ahmad, I., Clin. Chem., 1978 ; 24(10) : 1850-1851.
10. Fritsche, H. A. et Adams-Park, H. R., Clin. Chem., 1972 ; 18(5) : 417-421.
11. Lee, L. M. et Kenny, M. A., Clin. Chem., 1975 ; 21(8) : 1128-1135.

12. Eastman, J. R. et Bixler, D., Clin. Chem., 1977 ; 23(9) : 1769-1770.
13. Cherian, A. G. et Hill, J. G., Am. J. Clin. Pathol., 1978 ; 70(5) : 783-789.
14. Nerenburg, S.T. 'Medical Technology', Lea and Febiger Inc., Philadelphie, 122-123, 1973.
15. Viot, M. et al., Biomedicine, 1979 ; 31 : 74-77.
16. Posen, S. et al., Ann. Int. Med., 1965 ; 62(6) : 1234-1243.
17. Stepan, J. et Vecerek, B., Acta Univ. Carol., 1977 ; mono 77 : 135-140.
18. O'Carroll, D. et al., Am. J. Clin. Pathol., 1975 ; 63 : 564-572.
19. Rhone, D. P. et Mizuno, F. M., Am. J. Clin. Pathol., 1973 ; 59 : 531-541.
20. Johnson, R. B. et al., Clin. Chem., 1972 ; 18(2) : 110-115.
21. Rosalki, S. B. et Foo, A. Y., Clin. Chem., 1985 ; 31(7) : 1198-2000.





## SAS-MX AP-ISOENZYM

### ANWENDUNGSBEREICH

Das SAS-MX AP-Isoenzym Kit ist zur Auftrennung und quantitativen Bestimmung von Isoenzymen der alkalischen Phosphatase durch Elektrophorese im Agarose-Gel bestimmt.

Alkalische Phosphatase (AP) (EC 3.1.3.1) ist ein Enzym, das im alkalischen pH-Bereich die Hydrolyse von Phosphatestern katalysiert.

Die größten AP-Konzentrationen befinden sich in Leber, Knochen, Intestinum und der Plazenta. Es enthält jedoch fast jedes Körpergewebe zumindest eine geringe Konzentration an AP. Aufgrund dieser weiten Verbreitung ist der Wert einer quantitativen Bestimmung der Gesamt-AP begrenzt. Da jedoch jedes AP produzierende Gewebe ein prädominantes Isoenzym bildet, lässt sich die Gewebequelle einer erhöhten AP im Serum anhand des Isoenzym-Typs bestimmen.

Die Isoenzyme der AP haben unterschiedliche physio-chemische und elektrophoretische Eigenschaften und lassen sich anhand dieser Unterschiede bestimmen. Neben den Isoenzymen der Leber (einschl. Galle), Knochen, des Intestinums und der Plazenta wurden noch andere AP-Isoenzyme im Serum identifiziert. Dazu zählen Regan, Nagao, PA und Nieren-Isoenzyme.

Das SAS-MX AP-Isoenzym Verfahren ist eine High Resolution Elektrophorese-Methode, in der die Unterschiede in der Reaktion der Isoenzyme auf Neuraminidase<sup>2,3</sup> verwendet werden und ein Detergenz im Gel trennt Leber von Galle. Das Ergebnis ist eine Auftrennung, bei der die Leber, Knochen, makrohepatischen und interstinalen AP-Isoenzyme zur Diagnose und Therapie von Erkrankungen der Leber, Knochen, Nebenschilddrüsen sowie intestinalen Erkrankungen getrennt werden können. Mit diesem Verfahren lassen sich die intestinalen Isoenzyme in 3 deutliche Banden auftrennen, wobei die klinische Bedeutung noch nicht fest steht.

### WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle Reagenzien sind nur zur in-vitro Diagnostik bestimmt. Nicht einnehmen oder mit dem Mund pipettieren. Beim Umgang mit den Kit-Komponenten ist das Tragen von Handschuhen erforderlich. Bitte lesen Sie das Sicherheitsdatenblatt mit den Gefahrenhinweisen und Sicherheitsvorschlägen sowie die Informationen zur Entsorgung.

### INHALT

#### 1. SAS-MX AP-Isoenzym-Gel

Enthält Agarose in einem Tris / Barbitallpuffer mit Natriumazid und Thiomersal als Konservierungsmittel. Das Gel ist gebrauchsfertig verpackt.

#### 2. Tris-Barbital-Pufferkonzentrat

Enthält Barbital und Natriumbarbital mit Natriumazid als Konservierungsmittel. Den Inhalt der Flasche mit dest. Wasser auf 1 Liter verdünnen. Gut schütteln. Puffersalze können beim Stehen lassen leicht kristallisieren. Kristalle mit der verdünnten Pufferlösung aus der Flasche spülen, um eine vollständige Auflösung sicherzustellen.

#### 3. SAS-MX AP Trennungsbeschleuniger

Enthält Neuraminidase aus Vibrio Cholerae (EC 3.2.1.18). Der Trennungsbeschleuniger ist gebrauchsfertig verpackt.

#### 4. SAS-MX AP Isoenzym-Substrat

Enthält BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat) in 2-Amino-2-methyl-1,3-propanediol-Puffer. Das Isoenzym-Substrat ist gebrauchsfertig verpackt.

#### 5. SAS-MX AP Isoenzym-Chromagen

Enthält NBT-Pulver (Nitroblautetrazol). Siehe SCHRITT-FÜR-SCHRITT METHODE für die Rekonstitutionsanleitung.

### 6. Weitere Kit-Komponenten

Jedes Kit enthält eine Methodenbeschreibung sowie ausreichend Auftragschablonen, Blotter A, B, C, D und Elektrodenstreifen für 10 Gele.

### LAGERUNG UND STABILITÄT

#### 1. SAS-MX Alkalische Phosphatase Gel

Gele sollten bei 15...30°C gelagert werden und sind bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. NICHT IM KÜHLSCHRANK ODER TIEFKÜHLSCHRANK AUFBEWAHREN! Der Zustand des Gels kann sich verschlechtern. Dafür gibt es folgende Merkmale: 1) Kristallisation weist auf vorangegangenes Einfrieren hin, 2) Risse und Ablösen weisen auf ein Austrocknen des Gels hin, und 3) sichtbare Kontamination der Agarose durch Bakterien oder Pilze.

#### 2. Tris-Barbital-Puffer

Das Pufferkonzentrat sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Die verdünnte Pufferlösung ist bei einer Temperatur von 15...30°C für 2 Monate stabil. Trübung oder schlechte Ergebnisse des verdünnten Puffers können auf einen Verfall hinweisen.

#### 3. SAS-MX AP-Isoenzym Trennungsbeschleuniger

Der Trennungsbeschleuniger sollte bei 2...6°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Trübung oder schlechte Ergebnisse können auf Verfall hinweisen.

#### 4. Alkalische Phosphatase Substrat

Das Alkalische Phosphatase Substrat sollte bei 2...6°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Verfärbung oder schlechte Ergebnisse können auf Verfall hinweisen.

#### 5. Alkalische Phosphatase Chromagen

Das Alkalische Phosphatase Chromagen sollte bei 2...6°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Kontamination vermeiden. Rekonstituiertes Chromagen sollte innerhalb von 30 Minuten nach Ansatz verwendet werden.

### NICHT MITGELIEFERTES, ABER BENÖTIGTES MATERIAL

Kat. Nr. 4063 SAS-MX Kammer

Kat. Nr. 1525 EPS600 Netzteil

Kat. Nr. 3039 Kühlplatte für Kammer

Kat. Nr. 5014 Entwicklungsgewicht

Kat. Nr. 4062 Inkubationskammer

Trockenschrank mit Umluft und einer Temperaturleistung von 60...70°C.

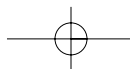
Inkubator mit einer Temperaturleistung von 45°C.

Glasplatte

Vortex-Mischer

Entfärbelösung: 100ml Eisessig mit 900ml dest. Wasser mischen. In einer fest verschlossenen Flasche aufbewahren.

Dest. Wasser



**PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG**

Frisch entnommenes Serum ist das Untersuchungsmaterial der Wahl. Serum sollte nach der Blutentnahme so schnell wie möglich vom Blutkuchen entfernt werden. Oxalat-, Citrat- oder EDTA-Plasma können nicht verwendet werden, da diese Substanzen die Aktivität der alkalischen Phosphatase<sup>4</sup> hemmen. Der Gesamt-AP-Wert ist mit einer entsprechenden Methode zu ermitteln. Patienten müssen zur Blutentnahme nüchtern sein. Sekretor-Patienten der Blutgruppen O oder B können etwa 2 Stunden nach einer fettreichen Mahlzeit erhöhte intestinale AP-Werte aufweisen<sup>4,6</sup>. Es wird empfohlen, das Serum so schnell wie möglich nach Entnahme zu testen. Serum sollte bei 2...6°C gelagert werden. Falls erforderlich kann das Serum für maximal 24 Stunden bei -20°C tief gefroren gelagert werden<sup>7,8</sup>.

**Störfaktoren:** 1) Phosphat, Oxalat, Citrat und Cyanid hemmen AP-Aktivität<sup>4,8</sup>, 2) Glycin im Überschuss kann AP durch Komplexbildung mit Magnesium-Ionen hemmen, 3) EDTA hemmt einige AP-Isoenzyme, 4) Verschiedene Medikamente verursachen ein enzymatisches Ungleichgewicht, das den AP-Wert beeinflussen kann<sup>9</sup>.

Proben mit hohen Gesamt-AP-Werten können verdünnt werden, sollte die hohe Aktivität die Unterscheidung der Isoenzym-Typen beeinträchtigen. **BITTE BEACHTEN:** Verdünnungen sollten nicht mit Kochsalzlösung oder Wasser hergestellt werden, da die Wanderung der Isoenzyme dadurch beeinträchtigt würde. Verdünnungen sollten mit Serum eines männlichen Spenders erfolgen, das zur Zerstörung endogener AP-Aktivität Hitze behandelt wurde (15-20 Minuten bei 56°C). Die Eignung des Serums als Verdünnungsmittel vor Gebrauch prüfen.

**SCHRITT-FÜR-SCHRITT METHODE**

**BITTE BEACHTEN:** Sicherstellen, dass das Kühlelement der Kammer für mindestens 60 Minuten vor Gebrauch bei 2...6°C gelagert wurde.

1. Zu jeweils 25µl Probe / Kontrolle 5µl Trennungsbeschleuniger geben und bei 15...30°C 5 Minuten inkubieren. **BITTE BEACHTEN:** Für eine optimale Auftrennung die angegebenen Zeiten einhalten.
2. Das Gel aus der Verpackung nehmen und auf ein Papiertuch legen. Die Geloberfläche mit einem Blotter C blotten und Blotter verwerfen.
3. Die Auftragschablone so auf das Gel legen, dass die Pfeile am Rand des Gels liegen. Blotter A auf die Schablone legen und mit einem Finger über die Schlitze der Schablone streichen, um eine gute Haftung zu gewährleisten. Blotter A entfernen und ihn bis zur Verwendung in Schritt 6 beiseite legen.
4. 5µl der Probe in jeden Schablone Schlitz pipettieren. Die Probe 10 Minuten ins Gel diffundieren lassen.
5. Während die Proben diffundieren, 100ml Puffer in die äußeren Bereiche der SAS-MX-Kammer füllen. Kühlblock der Kammer in die mittlere Rinne der Kammer legen und die Oberfläche mit einigen Tropfen Puffer anfeuchten.
6. Nach Absorption der Probe den Blotter A aus Schritt 3 auf die Schablone drücken. Anschließend Schablone und Blotter entfernen.
7. Das Gel mit der Agaroseseite nach oben auf den Kühlblock legen und auf übereinstimmende Polarisierung achten (Pluszeichen auf dem Gel und Pluszeichen in der Kammer). Unter dem Gel eingeschlossene Luftblasen unbedingt vermeiden.

**SAS-MX AP-ISOENZYM**

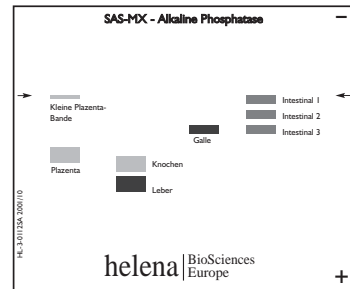
8. Für jede Seite des Gels einen Elektrodenstreifen vorbereiten, indem 3 Streifen in 2 Sets zusammengelegt werden, damit 2 dicke Streifen entstehen. Jeden Streifen in Puffer eintauchen, sanft den überschüssigen Puffer ausdrücken und jeden Streifen an den Rand des Gels, parallel zum Rand des Kühlblocks anbringen. Sicherstellen, dass ein Teil des Streifens in der Pufferlösung eintaucht. Mit dem Finger über den Streifen auf dem Gel fahren, um einen guten Kontakt zu gewährleisten.
9. Gel-Elektrophorese durchführen: 250 Volt, 30 Minuten.
10. Während die Elektrophorese läuft, ein mit Wasser angefeuchteten Zellstoff in die Inkubationskammer legen und zum Anwärmen in den 45°C warmen Inkubator legen.
11. Ungefähr 10 Minuten vor Ende der Elektrophorese 1 Fläschchen AP-Isoenzym Chromagen durch Zugabe von 1ml AP-Substrat rekonstituieren. 30 Sekunden mit dem Vortex-Mischer mischen und bis zum Gebrauch ruhen lassen.
12. Nach der Elektrophorese das Gel mit der Agarose-Seite nach oben auf die Glasplatte legen. Den Inhalt des Fläschchens mit AP-Isoenzym entlang einer Seite des Gels gießen.
13. Das Reagenz mit einer Pasteurpipette auf der Geloberfläche verteilen. Nach 15 Sekunden das Verteilen wiederholen, noch mal 15 Sekunden warten und den Überschuss vom Gel abrollen.
14. Gel in die Inkubationskammer legen. Gel inkubieren: 30 Minuten, 45°C.
15. Das Gel 5 Minuten in Entfärbelösung waschen.
16. Das Gel auf mit der Agarose-Seite nach oben auf einen Blotter D legen. Ein Blotter B (mit Entfärbelösung angefeuchtet) auf die Geloberfläche legen, gefolgt von 2 Blotter D. Das Gel 5 Minuten mit dem Entwicklungsgewicht pressen.
17. Gewicht und Blotter entfernen und Gel in dest. Wasser spülen.
18. Das Gel bei 60...70°C trocknen.

**AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE**

1. **Qualitative Auswertung:**  
Gele optisch auf das Vorhandensein bzw. Fehlen von Banden untersuchen.
2. **Quantitative Auswertung:**  
Die SAS-MX AP-Isoenzym-Gele (Gelseite nach unten) innerhalb 2 Stunden nach Fertigstellung bei 595 nm scannen.

In jedem Fall erfordert eine Erhöhung oder Verringerung bestimmter Serum-Komponenten bzw. der Nachweis ungewöhnlicher Serum-Komponenten eine weitere Untersuchung. Das fertige SAS-MX AP-Isoenzym-Gel sollte dunkel gelagert werden, um eine verstärkte Hintergrund-Färbung zu vermeiden. Die Auswertung der AP-Isoenzymmuster nicht ohne vorherige Bestimmung des Gesamt-AP im Patientenserum durchführen. Serum gesunder Probanden kann geringe Werte von Leber-, Knochen- oder intestinaler AP aufweisen<sup>10,11</sup>. Die Höhe des AP-Werts ist alters- und geschlechtsabhängig<sup>8,12,13</sup>. Schwangere können eine Plazenta-Bande zeigen. Die makrohepatische Bande, die bei neoplastischen Erkrankungen zu finden ist, muss unabhängig vom Gesamt-AP Wert als Hinweis für ein Krankheitsgeschehen interpretiert werden. Die Darstellung der seltenen Nagao-, Regan- und PA-Isoenzyme mit diesem System ist zurzeit nicht bekannt. Pathologische Banden sind bei Patienten mit normalen Gesamt-AP Werten beobachtet worden.

Abbildung 1 (unten) zeigt die Migrationsmerkmale der wichtigsten AP-Isoenzym-Banden in einem Diagramm.



Die Leber-Bande wandert von allen Banden am weitesten zur Anode. Die Leber-Bande bei Patienten mit einem hohen Gesamt-AP wandert wesentlich weiter in Richtung Anode als bei Patienten mit normalen Werten. Das Leberenzym ist das am häufigsten erhöhte Enzym bei erhöhten Gesamt-AP Werten<sup>6,10</sup>. Die Leber-AP erhöht sich bei einer Lebererkrankung schon sehr zeitig, noch bevor andere Leberfunktionstests abnormale Werte zeigen. Akute Hepatitis, Zirrhose, Fettleber, durch Medikamente ausgelöste Lebererkrankungen, Verschluss des Gallenflusses durch ein Pankreaskopfkarzinom, eine Verstopfung des Gallenganges, primäre biliäre Zirrhose der Leber sowie metastatische Leberkarzinome führen zu einer Erhöhung der AP<sup>8</sup>.

Neben der Leber-Bande, aber eher in Richtung Kathode laufend, befindet sich die Knochen-Bande. In Proben mit hoher Aktivität des Knochen-Isoenzym läuft die Knochen-Bande langsamer als bei Patienten mit Normalwerten. Im Gegensatz zum eher rechteckigen Aussehen der übrigen elektrophoretischen Banden hat die Knochen-Bande oft eine typisch quadratische Form. Das Knochen-Isoenzym ist in erster Linie wegen einer verstärkten Osteoblastenaktivität erhöht. Das Isoenzym ist normalerweise bei Kindern im Wachstum und Erwachsenen über fünfzig erhöht. Die höchsten AP-Werte sind einem erhöhten Knochen-Isoenzym beim Morbus Paget oder der renalen Rachitis zugeschrieben worden<sup>14</sup>. Ein pathologisch hoher Knochen-Isoenzym-Wert kann auch auf Knochenkarzinom, Osteomalazie oder Zöliakie hinweisen<sup>8</sup>. Eine erniedrigte Knochen-AP bei Kindern kann auf Kretinismus oder Hypophosphatasie beruhen.

Kathodal zur Knochen-Bande läuft die (schnelle Leber) makrohepatische Bande. Die makrohepatische AP ist bei metastasierenden Leberkarzinomen isoliert worden und kann bei der Diagnose solcher Fälle ein wichtiges Hilfsmittel sein. Es ist ebenfalls bei Patienten mit Virushepatitis, Alkohol-Zirrhose und anderen Lebererkrankungen isoliert worden. Viot und Mitarbeiter<sup>15</sup> haben Daten vorgelegt, die darauf hinweisen, dass eine hohe Korrelation der makrohepatischen AP die Anwesenheit von Lebermetastasen vermuten lässt. Viot berichtet ebenfalls, dass manchmal makrohepatische AP bei völlig gesunden Patienten nachgewiesen werden kann<sup>15</sup>.

Die intestinale AP-Isoenzym-Band(en) wandert kathodal zur makrohepatischen AP. Das Erscheinen von bis zu drei Banden kommt bei Patienten, die bei der Blutentnahme nicht nüchtern waren, häufiger vor.

Zur Identifikation der AP-Isoenzyme wie Regan, Nagao und PA benötigt man eventuell weitere Testmethoden wie Hitzeinaktivierung<sup>16</sup>, Essigsäurehemmung<sup>17,19</sup>, Harnsäuredenaturierung<sup>17,18</sup> oder Auftrennung auf Polyacrylamid-Gelen<sup>20,21</sup>.

#### QUALITÄTSKONTROLLE

Alkalische Phosphatase Isoenzym Kontrolle (Kat. Nr. 3059) enthält normale Konzentrationen an Leber- und Knochen-Isoenzymen und kann zur Überprüfung aller Phasen des Verfahrens eingesetzt und sollte bei jedem Lauf mitgeführt werden. Zulässige Assay-Werte der Packungsbeilage entnehmen.

#### REFERENZWERTE

Es wird empfohlen, die Auswertung der Gele gegen Normalwerte vorzunehmen, die für diesen Test in jedem einzelnen Labor ermittelt worden sind.

Eine Indikation normaler AP-Isoenzyme findet sich bei Rhone *et al*<sup>6</sup>, Fritsche *et al*<sup>10</sup> und Lee *et al*<sup>11</sup>.

#### LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

##### Reproduzierbarkeit

	Innerhalb eines Laufs (n=15)		Zwischen Läufen (n=75)	
	Mittelwert (%)	CV (%)	Mittelwert (%)	CV (%)
Leber	51.8%	3.4	51.8%	4.5
Knochen	48.3%	3.6	48.2%	4.8

##### Empfindlichkeit

Die Sensibilität der Methode beträgt 51 +/- 5.7IU pro Bande und wurde als die niedrigste AP-Isoenzym Konzentration ermittelt, die als diskrete Bande auf dem fertigen Gel zu erkennen war.

##### Linearität

Die Linearität der Methode ist abhängig von der Densitometer-Spezifikation sowie der Leistung des Gels. Es wird jedem Kunden empfohlen, die Linearität der Methode mit dem im Labor verwendeten Densitometer selbst zu bestimmen.

##### LITERATUR

1. Fishman, W.H. Am. J. Med., 1974; 56 : 617-650.
2. Moss, D.W. and Edwards, R.K. Clin. Chim. Acta, 1984; 143 : 177-182.
3. Moss, D.W. et al. Biochem. J., 1966; 98 : 32C-33C
4. Young, D.S. et al., 'Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests', 3rd Ed., AACC Press, Washington D.C., 1990.
5. Sundblad, L. et al Clin. Chim. Acta, 1973; 45 : 219-223.
6. Rhone, D.P. et al., Clin. Chem., 1973; 19(10) : 1142-1147.
7. Massion, C.G. and Frankenfeld, J.K., Clin. Chem., 1972; 18(4) : 366-373.
8. Wolf, P.L., Arch. Pathol. Lab. Med., 1978; 102 : 497-501.
9. Ahmad, I., Clin. Chem., 1978; 24(10) : 1850-1851.
10. Fritsche, H.A. and Adams-Park, H.R., Clin. Chem., 1972; 18(5) : 417-421.
11. Lee, L.M. and Kenny, M.A., Clin. Chem., 1975; 21(8) : 1128-1135.

12. Eastman, J.R. and Bixler, D., Clin. Chem., 1977; 23(9) : 1769-1770.
13. Cherian, A.G. and Hill, J.G., Am. J. Clin. Pathol., 1978; 70(5) : 783-789.
14. Nerenburg, S.T. Medical Technology, Lea and Febiger Inc., Philadelphia, 122-123, 1973.
15. Viot, M. et al., Biomedicine, 1979; 31 : 74-77.
16. Posen, S. et al., Ann. Int. Med., 1965; 62(6) : 1234-1243.
17. Stepan, J. and Vecerek, B., Acta Univ. Carol., 1977; Mono 77 : 135-140.
18. O'Carroll, D. et al., Am. J. Clin. Pathol., 1975; 63 : 564-572.
19. Rhone, D.P. and Mizuno, F.M., Am. J. Clin. Pathol., 1973; 59 : 531-541.
20. Johnson, R.B. et al., Clin. Chem., 1972; 18(2) : 110-115.
21. Rosalki, S.B. and Foo, A.Y., Clin. Chem., 1985; 31(7) : 1198-2000.

## **GEL SAS-MX PER ISOENZIMA ALP**

### **PRINCIPIO**

Il kit per isoenzima ALP SAS-MX è stato formulato per separare e quantificare gli isoenzimi della fosfatasi alcalina mediante elettroforesi in gel di agarosio.

La fosfatasi alcalina (ALP) (EC 3.1.3.1) è un enzima che catalizza l'idrolisi degli esteri di fosfato a pH alcalino.

Le maggiori concentrazioni di ALP sono presenti nel fegato, nelle ossa, nell'intestino e nella placenta. Tuttavia, praticamente ogni tessuto del corpo contiene almeno una piccola quantità di ALP. A causa di questa vasta distribuzione, l'utilità di una quantificazione totale della ALP è limitata. Fortunatamente, ogni fonte di ALP produce un isoenzima predominante, così è possibile determinare la fonte tissutale degli elevati livelli di ALP, identificando il tipo di isoenzima prodotto.

Gli isoenzimi della ALP differiscono nelle loro proprietà biochimiche ed elettroforetiche, pertanto, sfruttando tali differenze, è possibile identificare i singoli isoenzimi. Oltre agli isoenzimi epatici (compresi quelli epatobiliari), ossei, intestinali e placentari, sono stati identificati altri isoenzimi ALP nel siero. Fra questi vi sono Regan, Nagao, PA e isoenzimi renali.

La procedura SAS-MX per isoenzimi ALP è un metodo elettroforetico ad alta risoluzione, che si avvale delle differenze nella risposta degli isoenzimi alla neuramminidasi<sup>2,3</sup> oltre che alla presenza di una sostanza all'interno del gel per separare gli isoenzimi epatici ed epatobiliari. Il risultato è una distinzione in grado di separare gli isoenzimi ALP epatici, ossei, epatobiliari ed intestinali da utilizzare nella diagnosi e nella cura dei disturbi epatici, ossei, paratiroidei ed intestinali. Questo sistema è in grado di separare l'isoenzima intestinale in 3 bande distinte - il cui significato clinico non è stato ancora definito.

### **AVVERTENZE E PRECAUZIONI**

Tutti i reagenti devono essere utilizzati esclusivamente per diagnostica in vitro. Non ingerire né pipettare con la bocca i componenti del kit. Indossare guanti protettivi durante l'uso dei componenti del kit. Per le indicazioni relative ai rischi e alla sicurezza e le informazioni sullo smaltimento, fare riferimento alle schede tecniche dei prodotti.

### **COMPOSIZIONE**

#### **1. Gel SAS-MX per isoenzima ALP**

Contiene agarosio in un tampone tris / barbital con sodio azide e tiomersale come conservanti. Il gel è pronto all'uso così come viene fornito.

#### **2. Tampone concentrato tris / barbital**

Contiene barbital e sodio barbital con l'aggiunta di sodio azide come conservante. Diluire l'intero contenuto del flacone ad 1 litro con acqua distillata e miscelare bene. I sali di tampone possono cristallizzarsi leggermente in posizione verticale. Lavare via tutti i cristalli dal flacone con un tampone diluito per assicurarne la completa dissoluzione.

#### **3. Separatore SAS-MX ALP**

Contiene neuramminidasi proveniente dal vibrione del colera (EC 3.2.1.18). Il separatore è pronto all'uso così come viene fornito.

#### **4. Substrato per isoenzima ALP SAS-MX**

Contiene BCIP (5-Bromo-4-cloro-3-indolilfosfato) in tampone 2-ammino-2-metile-1,3-propandiolo. Il substrato per isoenzima è pronto all'uso così come viene fornito.

#### **5. Cromogeno per isoenzima ALP SAS-MX**

Contiene polvere NBT (nitroblu di tetrazolio). Ved. il paragrafo PROCEDURA per le istruzioni di ricostituzione.

**6. Altri componenti del kit**

Ogni kit contiene un foglio procedurale, mascherine per l'applicazione dei campioni, blotter A, B, C e D e stoppini in quantità sufficiente per completare 10 gel.

**CONSERVAZIONE E STABILITÀ****1. Gel per fosfatasi alcalina SAS-MX**

I gel devono essere conservati a 15...30°C e sono stabili fino alla data di scadenza riportata sulla confezione. **NON REFRIGERARE O CONGELARE LE PIASTRE.** Il deterioramento del gel può essere indicato da 1) formazioni cristalline per effetto di congelamento, 2) screpolature e fessurazione per effetto di essiccamento oppure, 3) contaminazione visibile dell'agarosio causata da batteri o funghi.

**2. Tampone tris / barbital**

Il tampone concentrato deve essere conservato a 15...30°C ed è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. Il tampone diluito è stabile per 2 mesi a 15...30°C. La torbidezza o le scarse prestazioni del tampone diluito possono indicare un suo deterioramento.

**3. Separatore SAS-MX per isoenzima ALP**

Il separatore deve essere conservato a 2...6°C ed è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. La torbidezza o le scarse prestazioni possono indicare un deterioramento.

**4. Substrato per fosfatasi alcalina**

Il substrato per fosfatasi alcalina deve essere conservato a 2...6°C ed è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. L'alterazione del colore o le scarse prestazioni possono indicare un deterioramento.

**5. Cromogeno per fosfatasi alcalina**

Il cromogeno per fosfatasi alcalina deve essere conservato a 2...6°C ed è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. Evitare la contaminazione. Il cromogeno ricostituito deve essere utilizzato entro 30 minuti dalla preparazione.

**MATERIALI NECESSARI, MA NON IN DOTAZIONE**

Cod. N. 4063 Camera SAS-MX

Cod. N. 1525 Alimentatore EPS600

Cod. N. 3039 Dispositivo di raffreddamento camera

Cod. N. 5014 Peso di sviluppo

Cod. N. 4062 Camera d'incubazione

Forno di essiccazione ad aria forzata con temperature di 60...70°C

Incubatrice prevista per 45°C

Piastra in vetro

Vortex

Soluzione decolorante: Mescolare 100ml di acido acetico glaciale e 900ml di acqua distillata.

Conservare in una bottiglia tappata ermeticamente.

Acqua distillata

**GEL SAS-MX PER ISOENZIMA ALP****RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE**

Il siero fresco è il campione da preferire. È opportuno rimuovere gli eritrociti dal siero il più presto possibile dopo il prelievo ematico. I campioni contenenti ossalato, citrato o EDTA non possono essere utilizzati in quanto dette sostanze inibiscono l'attività della fosfatasi alcalina<sup>4</sup>. Il livello totale di ALP deve essere determinato mediante un metodo adeguato.

I pazienti devono essere a digiuno. I soggetti con gruppo sanguigno O o B<sub>1</sub>, che sono secretori, possono avere un'ALP intestinale elevata a circa 2 ore da un pasto ricco di grassi<sup>4,6</sup>.

Si raccomanda di testare il siero il più presto possibile dopo il prelievo e di conservarlo a 2...6°C. Se necessario, il siero deve essere conservato congelato a -20°C per un massimo di 24 ore<sup>7,8</sup>.

**Fattori d'interferenza:** 1) Il fosfato, l'ossalato, il citrato e il cianuro possono inibire l'attività ALP<sup>4,8</sup>. 2) Un eccesso di glicina può inibire l'ALP legando gli ioni di magnesio. 3) L'EDTA può inibire alcuni isoenzimi ALP<sup>4</sup>. 4) Numerosi farmaci possono causare uno squilibrio enzimatico, che può influenzare il livello di ALP<sup>9</sup>.

I campioni con elevata attività ALP totale possono essere diluiti qualora questa elevata attività influisca sulla capacità di distinguere i vari tipi di isoenzimi. **NOTA:** È consigliabile non preparare le diluizioni in soluzione fisiologica o in acqua, in quanto si influenzerebbe la migrazione degli isoenzimi. Le diluizioni devono essere preparate nel siero di un donatore maschio, trattato termicamente, (56°C per 15-20 minuti) in modo da distruggere l'attività endogena dell'ALP. Si raccomanda di verificare prima dell'uso l'idoneità del siero da utilizzare come diluente.

**PROCEDURA DETTAGLIATA**

**NOTA:** Assicurarsi che il dispositivo di raffreddamento della camera sia stato conservato a 2...6°C per almeno 60 minuti prima dell'uso.

- Ad ogni 25µl di campione o controllo aggiungere 5µl di separatore ed incubare a 15...30°C per 5 minuti. **NOTA:** Al fine di ottenere una separazione ottimale, è importante rispettare i tempi indicati.
- Rimuovere il gel dalla confezione e collocarlo su una bibula. Far assorbire la superficie del gel con un blotter C. Eliminare il blotter C.
- Allineare la mascherina per l'applicazione del campione rispetto alle frecce presenti sul bordo del gel. Porre un blotter A sopra alla mascherina ed effettuare una leggera pressione con le dita sulle fessure per verificare il corretto contatto. Rimuovere il blotter e conservarlo per il passaggio 6.
- Applicare 5µL di campione in ogni fessura di semina e lasciare assorbire per 10 minuti.
- Durante l'assorbimento del campione, collocare 100ml di tampone in ogni compartimento esterno della camera SAS-MX. Collocare il dispositivo di raffreddamento della camera nel pozzetto centrale di quest'ultima e inumidire la superficie con alcune gocce di tampone.
- Dopo l'assorbimento del campione, asciugare leggermente la mascherina con il blotter A, conservato dal passaggio 3, quindi eliminare mascherina e blotter.
- Collocare il gel sulla parte superiore del dispositivo di raffreddamento con l'agarosio rivolto verso l'alto, allineando i lati positivo (+) e negativo (-) rispetto alle posizioni corrispondenti sulla camera. Prestare attenzione ad evitare di intrappolare bolle d'aria sotto il gel.
- Preparare uno stoppino per ogni lato del gel, collocando 3 stoppini insieme in 2 serie, per ottenere 2 stoppini spessi. Immergere ogni stoppino nel tampone, spremere delicatamente per fare fuoriuscire il tampone in eccesso e fissare ogni stoppino al bordo del gel, parallelamente al bordo del dispositivo di raffreddamento. Assicurarsi che un bordo dello stoppino sia immerso nel tampone e strofinare un dito sulla parte dello stoppino presente sul gel, per garantire un contatto ottimale.

9. Sottoporre il gel ad elettroforesi: 250 Volt per 30 minuti.
10. Mentre i campioni vengono sottoposti ad elettroforesi, collocare una striscia di carta assorbente inumidita con acqua nella camera d'incubazione e sistemare nell'incubatrice regolata a 45°C in modo tale da consentirne la stabilizzazione.
11. Circa 10 minuti prima della conclusione dell'elettroforesi, ricostituire un flacone di cromogeno per isoenzimi ALP aggiungendo 1ml di substrato per ALP. Passare al vortex per 30 secondi e lasciar riposare fino all'utilizzo.
12. Al termine dell'elettroforesi, mettere il gel su una piastra di vetro con il lato dell'agarosio rivolto verso l'alto. Versare il contenuto del flacone di isoenzimi ALP lungo il bordo del gel.
13. Distribuire il reagente per tutta la superficie del gel per mezzo della pipetta sierologica. Attendere 15 secondi e distribuire nuovamente, attendere altri 15 secondi, poi rimuovere la parte in eccesso dal gel.
14. Introdurre il gel nella camera d'incubazione. Incubare il gel: 30 minuti a 45°C.
15. Sciacquare il gel nella soluzione decolorante per 5 minuti.
16. Collocare il gel su un blotter D, con il lato dell'agarosio rivolto verso l'alto, e posizionare un blotter B (bagnato in soluzione decolorante) sulla superficie del gel, seguito da 2 blotter D. Comprimerne il gel per 5 minuti utilizzando il peso di sviluppo.
17. Rimuovere il peso ed i blotter e risciacquare il gel in acqua distillata.
18. Asciugare il gel a 60...70°C.

#### INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI.

##### 1. Valutazione qualitativa:

I gel possono essere visualizzati qualitativamente per la presenza o assenza di particolari bande.

##### 2. Valutazione quantitativa:

leggere i gel SAS-MX per isoenzimi ALP (con il lato del gel rivolto verso il basso) entro 2 ore dalla conclusione del test a 595nm.

In entrambi i casi, un aumento o una diminuzione di determinate componenti del siero o il rilevamento di componenti di siero insolite richiedono un'analisi più approfondita. Il gel per isoenzimi ALP SAS-MX completato deve essere conservato al buio al fine di prevenire un aumento della colorazione dello sfondo.

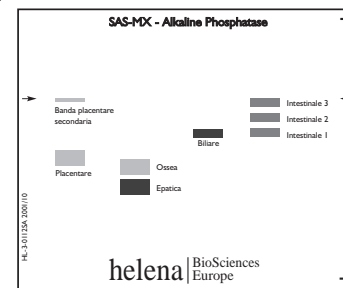
Si consiglia di non cercare di effettuare l'interpretazione dei pattern di isoenzimi ALP senza conoscere il livello di ALP totale nel siero del paziente. Il siero di individui normali può contenere modeste quantità di ALP epatica, ossea e intestinale<sup>6,10,11</sup>. I livelli di ALP dipendono dall'età e dal sesso<sup>8,12,13</sup>.

Le donne in gravidanza possono presentare una banda placentare. La banda epatobiliare osservata nelle neoplasie deve essere interpretata come un segnale d'allarme determinato da uno stato morboso, qualunque sia il livello totale di ALP.

I comportamenti dei rari isoenzimi Nagao, Regan e PA con questo sistema non sono, al momento, ancora noti. Sono state osservate bande anomale in pazienti con livelli normali di ALP totale.

#### GEL SAS-MX PER ISOENZIMA ALP

La figura 1 (qui sotto) mostra una rappresentazione sotto forma di diagramma delle caratteristiche di migrazione delle principali bande di isoenzimi dell'ALP.



La banda epatica presenta la migrazione più anodica fra tutte le bande. Nei pazienti con un'elevata ALP totale essa migrerà in modo più anodico rispetto a quella di un paziente con un livello normale. Quello epatico rappresenta l'enzima più frequentemente elevato quando sono presenti elevati livelli di ALP totale<sup>4,10</sup>. L'ALP epatica aumenta precocemente nelle patologie del fegato prima che la maggior parte dei test sulle funzioni epatiche mostrino anomalie. La grande quantità di condizioni morbose che determinano un aumento dei livelli di ALP epatica comprendono epatite acuta, cirrosi, fegato grasso, patologie epatiche da assunzione di farmaci, ostruzione del flusso biliare indotta da un carcinoma alla testa del pancreas, stenosi del dotto biliare, cirrosi biliare primaria e carcinoma metastatico al fegato<sup>9</sup>.

Vicino alla banda epatica, troviamo la banda ossea che migra più verso il catodo. Nei campioni che presentavano alte attività dell'isoenzima osseo, la banda ossea si sposta più lentamente di quella del soggetto normale. Essa possiede spesso una caratteristica forma quadrata, a differenza della più normale forma oblunga delle bande elettroforetiche. L'isoenzima osseo risulta aumentato in conseguenza della maggiore attività osteoblastica. Questo isoenzima risulta normalmente elevato nei bambini in fase di crescita e negli adulti oltre i 50 anni di età. I valori più elevati di ALP totale sono stati attribuiti ad un aumento dell'isoenzima osseo nella malattia di Paget o nel rachitismo renale<sup>14</sup>. Un livello insolitamente elevato dell'isoenzima osseo può essere indicativo di cancro alle ossa, osteomalacia o malattia celiaca<sup>8</sup>. Un ridotto livello di ALP ossea nei bambini può essere ricondotta a cretinismo o ipofosfatasi. La banda epatobiliare si sposta in modo catodico verso la banda ossea. La ALP epatobiliare è stata isolata in caso di carcinoma metastatico al fegato ed è consigliata come strumento diagnostico per identificare patologie di questo genere. E' stata isolata anche in pazienti affetti da epatite virale, cirrosi alcolica e altre patologie epatiche. I dati prodotti da Viot e colleghi<sup>15</sup> dimostrano che la ALP epatobiliare è strettamente correlata alla presenza di metastasi al fegato e che la presenza di questo isoenzima può essere indice dell'insorgenza di metastasi al fegato. Viot rileva inoltre che la ALP epatobiliare viene rilevata occasionalmente in pazienti che non presentano alcuna condizione morbosa<sup>15</sup>.

La(e) banda(e) dell'isoenzima ALP intestinale si dirige(ono) verso il catodo in direzione della banda epatobiliare. La comparsa di più bande, fino a tre, è più comune in campioni di pazienti non sottoposti a digiuno.

**GEL SAS-MX PER ISOENZIMA ALP**

L'identificazione di isoenzimi ALP come Regan, Nagao e PA può richiedere l'utilizzo di protocolli analitici supplementari come inattivazione a caldo<sup>16</sup>, inibizione ammino-acidica<sup>17,19</sup>, denaturazione dell'urea<sup>17,18</sup> o separazione su gel di poliacrilammide<sup>20,21</sup>.

**CONTROLLO QUALITÀ**

Il Controllo degli isoenzimi di fosfatasi alcalina (Cod. 3059) contiene livelli normali di isoenzimi epatici e ossei; può essere utilizzato per verificare tutte le fasi della procedura e deve essere utilizzato per ogni corsa della piastra. Fare riferimento alle schede all'interno della confezione per i valori accettabili del campione.

**VALORI DI RIFERIMENTO**

Si raccomanda di effettuare qualsiasi valutazione dei gel sulla base dei valori normali prodotti per questo esame in ogni singolo laboratorio.

Si può trovare un'indicazione dei livelli normali degli isoenzimi ALP in Rhone, et al<sup>6</sup>, Fritsche et al<sup>1</sup> e Lee et al<sup>1</sup>.

**CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI****Riproducibilità**

	Entro la serie (n=15)		Tra la serie (n=75)	
	Media (%)	CV (%)	Media (%)	CV (%)
Epatica	51.8%	3.4	51.8%	4.5
Ossea	48.3%	3.6	48.2%	4.8

**Sensibilità**

Tale metodo è sensibile a 51 +/- 5.7IU per banda, considerata la concentrazione minima dell'enzima ALP visibile come banda discreta sul gel completato.

**Linearità**

La linearità del metodo è una funzione della specificazione densitometrica nonché delle prestazioni del gel. Si raccomanda ad ogni cliente di determinare la linearità del metodo sulla base del densitometro in uso nel laboratorio.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Fishman, W.H. Am. J. Med., 1974; 56 : 617-650.
2. Moss, D.W. and Edwards, R.K. Clin. Chim. Acta, 1984; 143 : 177-182.
3. Moss, D.W. et al. Biochem. J., 1966; 98 : 32C-33C
4. Young, D.S. et al., 'Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests', 3rd Ed., AACC Press, Washington D.C., 1990.
5. Sundblad, L. et al Clin. Chim. Acta, 1973; 45 : 219-223.
6. Rhone, D.P. et al., Clin. Chem., 1973; 19(10) : 1142-1147.
7. Massion, C.G. and Frankenfeld, J.K., Clin. Chem., 1972; 18(4) : 366-373.
8. Wolf, P.L., Arch. Pathol. Lab. Med., 1978; 102 : 497-501.
9. Ahmad, I., Clin. Chem., 1978; 24(10) : 1850-1851.
10. Fritsche, H.A. and Adams-Park, H.R., Clin. Chem., 1972; 18(5) : 417-421.
11. Lee, L.M. and Kenny, M.A., Clin. Chem., 1975; 21(8) : 1128-1135.

12. Eastman, J.R. and Bixler, D., Clin. Chem., 1977; 23(9) : 1769-1770.
13. Cherian, A.G. and Hill, J.G., Am. J. Clin. Pathol., 1978; 70(5) : 783-789.
14. Nerenburg, S.T. Medical Technology, Lea and Febiger Inc., Philadelphia, 122-123, 1973.
15. Viot, M. et al., Biomedicine, 1979; 31 : 74-77.
16. Posen, S. et al., Ann. Int. Med., 1965; 62(6) : 1234-1243.
17. Stepan, J. and Vecerek, B., Acta Univ. Carol., 1977; Mono 77 : 135-140.
18. O'Carroll, D. et al., Am. J. Clin. Pathol., 1975; 63 : 564-572.
19. Rhone, D.P. and Mizuno, F.M., Am. J. Clin. Pathol., 1973; 59 : 531-541.
20. Johnson, R.B. et al., Clin. Chem., 1972; 18(2) : 110-115.
21. Rosalki, S.B. and Foo, A.Y., Clin. Chem., 1985; 31(7) : 1198-2000.

**USO PREVISTO**

El kit de isoenzimas SAS-MX ALP se utiliza para la separación y cuantificación de isoenzimas fosfatasa alcalinas mediante electroforesis con gel de agarosa.

La fosfatasa alcalina (ALP) (EC 3.1.3.1) es una enzima que cataliza la hidrólisis de esteres fosfáticos en un pH alcalino.

Las mayores concentraciones de ALP se encuentran en hígado, huesos, intestino y placenta. No obstante, prácticamente todos los tejidos del cuerpo contienen al menos una pequeña cantidad de ALP. Debido a esta amplia distribución, la utilidad de una cuantificación total de ALP es limitada. Afortunadamente, cada fuente de ALP produce una isoenzima predominante, y puede determinarse el tejido productor de la elevada ALP en suero identificando el tipo de isoenzima.

Las isoenzimas de ALP se diferencian por sus propiedades fisicoquímicas y electroforéticas y, aprovechando estas diferencias, las isoenzimas individuales pueden ser identificadas. Además de las isoenzimas del hígado (incluyendo macrohepáticas, o hígado compacto), huesos, intestino y de placenta, se han identificado isoenzimas ALP en suero. Estas incluyen isoenzimas Regan, Nagao, PA y renales.

El procedimiento de isoenzimas SAS-MX ALP es un método de electroforesis de alta resolución que utiliza las diferentes respuestas de las isoenzimas a las neuraminidasas<sup>2,3</sup> y un detergente en el gel para separar hígado y macrohepático (hígado compacto). El resultado es una separación capaz de separar isoenzimas ALP del hígado, huesos, macrohepáticas e intestinales para su uso en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades del hígado, huesos, paratiroides e intestinales. Este sistema puede separar la isoenzima intestinal en tres bandas diferentes - la importancia clínica de las mismas no ha sido aún determinada.

**ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES**

Todos los reactivos son exclusivamente para uso diagnóstico in-vitro. No ingerir ni chupar con la boca ningún componente del kit. Usar guantes para manejar todos los componentes del kit. Consultar la hoja con los datos de seguridad del producto acerca de los riesgos de los componentes, avisos de seguridad y consejos para su eliminación.

**COMPOSICIÓN****1. Gel para isoenzimas ALP SAS-MX**

Contiene agarosa en un tampón de Tris - Barbitol, con azida de sodio y tiomersal como conservantes. El gel viene envasado listo para usar.

**2. Concentrado tampón de Tris - Barbitol.**

Contiene barbitol y barbitol sódico con azida de sodio como conservante. Diluir el contenido del frasco en 1 litro de agua destilada y mezclar bien. Las sales tampón pueden cristalizar ligeramente al quedar en reposo. Lavar todos los cristales del frasco con el tampón diluido para asegurar una disolución completa.

**3. Potenciador de separación SAS-MX ALP.**

Contiene neuraminidasas de vibrio cólera (EC 3.2.1.18). El potenciador de separación viene envasado listo para usar.

**4. Substrato de isoenzimas SAS-MX ALP.**

Contiene BCIP (5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) en un buffer 2-amino-2-metil-1,3-propanediol. El substrato de isoenzimas viene envasado listo para usar.

**5. Cromógeno de isoenzimas SAS-MX ALP.**

Contiene NBT en polvo (nitroblue tetrazolium). Véanse las instrucciones de reconstitución en el PROCEDIMIENTO PASO A PASO.

**SAS-MX ISOENZIMAS ALP****6. Otros componentes del kit**

Cada kit contiene una hoja de instrucciones, suficientes plantillas de aplicación de la muestra, secantes A, B, C, D y mechas hasta completar 10 geles.

**ALMACENAMIENTO Y PERÍODO DE VALIDEZ****1. Gel de fosfatasa alcalina SAS-MX.**

Los geles han de almacenarse a 15...30°C y permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en el envase. NO REFRIGERAR NI CONGELAR LAS PLACAS. El deterioro del gel puede estar indicado por: 1) apariencia cristalina, indicativo de que el gel ha sido congelado, 2) agrietamiento y descamación, indicativo del resecamiento del gel, o 3) contaminación visible de la agarosa por fuentes bacterianas o micóticas.

**2. Concentrado Tampón de Tris - Barbitol.**

El concentrado tampón debe almacenarse a 15...30°C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del frasco. El concentrado tampón diluido permanece estable durante 2 meses a 15...30°C. Si el tampón diluido está turbio o presenta un mal comportamiento pueden ser indicios de deterioro.

**3. Potenciador de separación de isoenzimas SAS-MX ALP.**

El potenciador de separación debe guardarse a 2...6°C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del frasco. Si está turbio o presenta un mal rendimiento, puede indicar deterioro.

**4. Substrato de fosfatasa alcalina.**

El substrato de fosfatasa alcalina debe guardarse a 2...6°C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Si hay decoloración o mal rendimiento, puede indicar deterioro.

**5. Cromógeno de fosfatasa alcalina.**

El cromógeno de fosfatasa alcalina debe guardarse a 2...6°C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Evite la contaminación. El cromógeno reconstituido debe usarse en los 30 minutos siguientes a su preparación.

**ARTÍCULOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS**

Nº de catálogo 4063 Cámara SAS-MX

Nº de catálogo 1525 Fuente de alimentación EPS600

Nº de catálogo 3039 Dispositivo de enfriamiento de la cámara

Nº de catálogo 5014 Potencia de desarrollo

Nº de catálogo 4062 Cámara de Incubación

Horno de secado con aire a presión con capacidad de alcanzar 60...70°C

Incubadora capaz de alcanzar 45°C

Plato de vidrio

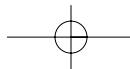
Agitadora vorticial

Solución decolorante: Mezclar 100ml de ácido acético cristalizado con 900ml de agua destilada.

Guardar en un frasco herméticamente cerrado.

Agua destilada





## SAS-MX ISOENZIMAS ALP

### RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

La muestra consistirá en suero recién obtenido. El suero ha de ser separado de las células rojas tan pronto sea posible tras la extracción de sangre. Las muestras que contengan oxalato, citrato o EDTA no pueden usarse, ya que estas sustancias impiden la actividad de la fosfatasa alcalina<sup>4</sup>. El nivel de ALP total será determinado por el método adecuado.

Los pacientes han de estar en ayunas. Los pacientes con grupo sanguíneo O o B que sean secretores pueden presentar un elevado ALP intestinal unas 2 horas después de ingerir una comida grasienta<sup>4,6</sup>. Se recomienda analizar el suero lo antes posible después de la recogida y almacenar dicho suero a 2...6°C.

Si fuera necesario, el suero se almacenaría congelado a -20°C durante no más de 24 horas<sup>7,8</sup>.

**Factores problemáticos:** 1) Fosfato, oxalato, citrato y cianuro pueden bloquear la actividad ALP<sup>4,8</sup>, 2) El exceso de glicina puede bloquear la ALP componiendo iones de magnesio, 3) EDTA puede bloquear algunas isoenzimas ALP<sup>9</sup>, 4) Algunas drogas causan un desequilibrio enzimático que puede afectar al nivel de ALP<sup>9</sup>.

Las muestras con una actividad total de ALP elevada pueden diluirse si la elevada actividad afecta a la capacidad de discriminar entre los diferentes tipos de isoenzimas. **NOTA:** Las diluciones no deben realizarse en soluciones salinas ni agua, ya que la migración de isoenzimas se verá afectada. Las diluciones han de realizarse en suero de un donante masculino que haya sido tratado con calor (56°C durante 15-20 minutos) para destruir la actividad endógena de la ALP. La idoneidad del suero para ser usado como diluyente ha de ser comprobada antes del uso.

### PROCEDIMIENTO PASO A PASO

**NOTA:** Asegurarse de que el dispositivo de enfriamiento de la cámara ha estado almacenado a 2...6°C durante al menos 60 minutos antes de su uso.

1. Para cada 25µl de muestra / control, añadir 5µl de potenciador de separación e incubar a 15...30°C durante 5 minutos. **NOTA:** Para una separación óptima es importante respetar los tiempos establecidos.
2. Sacar el gel del envase y colocarlo sobre una toallita de papel. Secar la superficie del gel con un secante C y luego desechar el secante.
3. Alinear la plantilla de aplicación de la muestra con las flechas existentes en el borde del gel. Aplicar un secante A sobre la parte superior de la plantilla y frotar con un dedo a lo largo de las rejillas para asegurar un buen contacto. Retirar el secante A y conservarlo para utilizarlo luego en el paso 6.
4. Aplicar 10µl de muestra en cada ranura y dejar que absorba durante 5 minutos.
5. Mientras la muestra es absorbida, verter aproximadamente 100ml del concentrado tampón en cada hueco exterior de la cámara SAM-MX. Colocar el dispositivo de enfriamiento de la cámara en el hueco central de la misma y humedecer la superficie con unas gotas de concentrado tampón.
6. Finalizada la absorción de la muestra, secar la plantilla con el secante A que se conserva del paso 3 y retirar el secante y la plantilla.
7. Colocar el gel sobre el dispositivo de enfriamiento, con la agarosa hacia arriba, alineando los lados positivo (+) y negativo (-) con las posiciones correspondientes en la cámara. Tener cuidado de evitar que queden burbujas de aire atrapadas bajo el gel.
8. Preparar una mecha para cada lado del gel, colocando 3 mechas juntas en 2 grupos, para formar 2 mechas gruesas. Sumergir cada mecha en el tampón, escurrir con cuidado el exceso de tampón y sujetar cada mecha al borde del gel, en paralelo con el borde del dispositivo de enfriamiento. Asegurarse de que un borde de la mecha esté sumergido en el tampón y frotar con un dedo sobre

la parte de la mecha que está sobre el gel para asegurar un buen contacto.

9. Realizar la electroforesis del gel: 250 voltios, 30 minutos.
10. Mientras se está realizando la electroforesis, colocar un papel humedecido con agua en la cámara de incubación y colocarlo en el incubador a 45°C para que se equilibre.
11. Aproximadamente 10 minutos antes del final de la electroforesis, reconstituir 1 vial de cromógeno de isoenzimas ALP añadiendo 1ml de substrato ALP. Agitar la mezcla durante 30 segundos y dejarlo aparte sin tocar hasta el momento de su uso.
12. Después de la electroforesis, colocar el gel con la agarosa hacia arriba sobre la placa de vidrio. Verter los contenidos del vial de isoenzima ALP a lo largo de un borde del gel.
13. Utilizando una pipeta serológica, distribuir el reactivo a través de la superficie del gel. Esperar 15 segundos y volver a extender, esperar 15 segundos y retirar del gel el exceso.
14. Colocar el gel en la cámara de incubación. Incubar el gel: 30 minutos, 45°C.
15. Lavar el gel en la solución decolorante durante 5 minutos.
16. Colocar el gel en un secante D con la agarosa hacia arriba y un secante B (humedecido en solución de decoloración) en la superficie del gel, seguido de 2 secantes C. Presionar el gel usando una potencia de desarrollo durante 5 minutos.
17. Retirar el peso y los secantes, y aclarar el gel en agua destilada.
18. Secar el gel a 60...70°C.

### INTERPRETACION DE RESULTADOS

#### 1. Evaluación cualitativa:

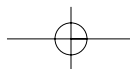
Los geles se pueden inspeccionar visualmente, para comprobar la existencia o ausencia de determinadas bandas de interés.

#### 2. Evaluación cuantitativa:

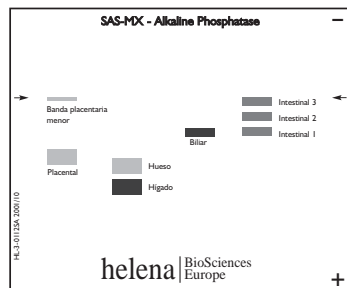
Examinar los geles de isoenzimas SAS-MX ALP (gel hacia abajo) en las 2 horas siguientes a la finalización, a 595nm.

En cualquier caso, un aumento o disminución de determinados componentes del suero o la detección de componentes inusuales en el suero, requieren ser investigados. El gel de isoenzimas SAS-MX ALP completado ha de almacenarse a oscuras para evitar que la coloración de fondo se intensifique. La interpretación de los modelos de isoenzimas ALP no debe intentarse sin conocer el nivel total de ALP en el suero del paciente. EL suero de un individuo normal puede contener pequeñas cantidades de ALP de hígado, hueso e intestino<sup>6,10,11</sup>. Los niveles de ALP dependen de la edad y el sexo<sup>8,12,13</sup>. Las mujeres embarazadas pueden mostrar una banda placentaria. La banda macrohepática (hígado compacto) observada en neoplasmas debe interpretarse como señal de alerta de un estado de enfermedad, independientemente del nivel total de ALP.

El comportamiento de las poco frecuentes isoenzimas Nagao, Regan y PA con este sistema se desconoce actualmente. Se han documentado bandas anormales en pacientes con niveles totales de ALP normales.



La Figura 1 (abajo) muestra una representación esquemática de las características migratorias de las principales bandas de isoenzimas ALP.



La banda hepática presenta la migración más anódica de todas las bandas. La banda hepática en pacientes con un ALP total elevado migrará de forma más anódica que la de un paciente con un nivel normal. La del hígado es la enzima elevada con más frecuencia cuando los niveles totales de ALP son elevados<sup>6,10</sup>. El ALP del hígado aumenta pronto en las enfermedades hepáticas antes de que la mayoría de los demás tests de funcionamiento del hígado muestren anomalías. El amplio grupo de condiciones que conducen a un aumento del ALP del hígado incluye hepatitis aguda, cirrosis, hígado graso, enfermedades hepáticas provocadas por drogas, obstrucción del flujo biliar por carcinoma en la cabeza del páncreas, contracción del conducto biliar, cirrosis biliar primaria y carcinoma metastásico del hígado<sup>8</sup>.

Al lado de la banda hepática, discurrendo de forma más catódica, está la banda ósea. En las muestras que contienen una actividad elevada de isoenzimas del hueso, la banda ósea discurre más despacio que la de un paciente normal. La banda ósea presenta a menudo una forma cuadrada característica, en contraste con la forma oblonga más normal de las bandas electroforéticas. La isoenzima del hueso aumenta como resultado del aumento de la actividad osteoblástica. Esta isoenzima es normalmente elevada en los niños en fase de crecimiento y adultos de más de 50 años. Los valores totales más altos de ALP se han atribuido al aumento de la isoenzima del hueso en la enfermedad de Paget o raquitismo renal<sup>14</sup>. Un nivel anormalmente alto de isoenzima del hueso puede ser también indicativo de cáncer de huesos, osteomalacia o canal celíaco<sup>8</sup>. Un descenso del ALP óseo en niños puede atribuirse a cretinismo o hipofosfatasa.

Discurrendo de forma catódica respecto a la banda ósea está la banda macrohepática (hígado compacto). Se ha aislado ALP macrohepático en casos de carcinoma metastásico del hígado y se ha sugerido como herramienta de diagnóstico para identificar tales casos. También se ha aislado en pacientes con hepatitis vírica, cirrosis alcohólica y otras enfermedades hepáticas. Los datos generados por Viot y asociados<sup>15</sup> sugieren que el ALP macrohepático está íntimamente relacionado con la presencia de metástasis en el hígado y que la presencia de esta isoenzima podría predecir la aparición de metástasis hepática. Viot documenta asimismo que el ALP macrohepático se detecta ocasionalmente en pacientes que no presentan ningún estado de enfermedad<sup>15</sup>.

## SAS-MX ISOENZIMAS ALP

La(s) banda(s) de isoenzimas intestinales ALP discurre(n) de forma catódica en relación con la macrohepática. La aparición de hasta tres bandas es más frecuente en muestras obtenidas de pacientes que no estaban en ayunas.

La identificación de isoenzimas ALP tales como Regan, Nagao y PA puede requerir el uso de protocolos de prueba adicionales, como inactivación térmica<sup>17,19</sup>, inhibición de aminoácidos<sup>17,19</sup>, desnaturalización de urea<sup>17,18</sup> o separación en geles de poliacrilamida<sup>20,21</sup>.

### CONTROL DE CALIDAD

El control de isoenzimas fosfatasa alcalinas (Nº de catálogo 3059) contiene niveles normales de isoenzimas de hígado y huesos, puede utilizarse para verificar todas las fases del procedimiento y ha de usarse en cada serie de placas. Consultar información adicional en el envase sobre los valores de ensayo aceptables.

### VALORES DE REFERENCIA

Se recomienda realizar cualquier evaluación de los geles con respecto a valores normales obtenidos para este test en cada laboratorio individual.

Una indicación de isoenzimas ALP normales se puede encontrar en Rhone y otros<sup>6</sup>, Fritsche y otros<sup>10</sup> y Lee y otros<sup>11</sup>.

### CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES

#### Reproductibilidad

	Durante la prueba (n=15)		Entre pruebas (n=75)	
	Media	CV (%)	Media	CV (%)
Hígado	51.8%	3.4	51.8%	4.5
Hueso	48.3%	3.6	48.2%	4.8

#### Sensibilidad

El método es sensible a 51 +/- 5.7IU por banda, determinada como la concentración más baja de isoenzimas ALP evidente en forma de una banda discreta sobre el gel completado.

#### Linealidad

La linealidad del método está en función de la especificación del densitómetro así como de las características del gel. Es aconsejable que cada cliente determine la linealidad del método basándose en el densitómetro utilizado en el laboratorio.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Fishman, W.H. Am. J. Med., 1974; 56 : 617-650.
2. Moss, D.W. and Edwards, R.K. Clin. Chim. Acta, 1984; 143 : 177-182.
3. Moss, D.W. et al. Biochem. J., 1966; 98 : 32C-33C
4. Young, D.S. et al., 'Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests', 3rd Ed., AACC Press, Washington D.C., 1990.
5. Sundblad, L. et al Clin. Chim. Acta, 1973; 45 : 219-223.
6. Rhone, D.P. et al., Clin. Chem., 1973; 19(10) : 1.142-1.147.
7. Massion, C.G. and Frankenfeld, J.K., Clin. Chem., 1972; 18(4) : 366-373.
8. Wolf, P.L., Arch. Pathol. Lab. Med., 1978; 102 : 497-501.
9. Ahmad, I., Clin. Chem., 1978; 24(10) : 1.850-1.851.

10. Fritsche, H.A. and Adams-Park, H.R., *Clin. Chem.*, 1972; 18(5) : 417-421.
11. Lee, L.M. and Kenny, M.A., *Clin. Chem.*, 1975; 21(8) : 1.128-1.135.
12. Eastman, J.R. and Bixler, D., *Clin. Chem.*, 1977; 23(9) : 1.769-1.770.
13. Cherian, A.G. and Hill, J.G., *Am. J. Clin. Pathol.*, 1978; 70(5) : 783-789.
14. Nerenburg, S.T. 'Medical Technology', Lea and Febiger Inc., Philadelphia, 122-123, 1973.
15. Viot, M. et al., *Biomedicine*, 1979; 31 : 74-77.
16. Posen, S. et al., *Ann. Int. Med.*, 1965; 62(6) : 1.234-1.243.
17. Stepan, J. and Vecerek, B., *Acta Univ. Carol.*, 1977; Mono 77 : 135-140.
18. O'Carroll, D. et al., *Am. J. Clin. Pathol.*, 1975; 63 : 564-572.
19. Rhone, D.P. and Mizuno, F.M., *Am. J. Clin. Pathol.*, 1973; 59 : 531-541.
20. Johnson, R.B. et al., *Clin. Chem.*, 1972; 18(2) : 110-115.
21. Rosalki, S.B. and Foo, A.Y., *Clin. Chem.*, 1985; 31(7) : 1.198-2.000.