

Nová referenční metoda stanovení katalytické koncentrace alkalické fosfatázy ALP (EC 1.3.1.3.).

J. Kratochvíla, B. Friedecký

V září 2011 bude publikována v časopise Clinical Chemistry Laboratory Medicine nová referenční metoda IFCC stanovení katalytické koncentrace alkalické fosfatázy [1], na kterou již dlouho odborná veřejnost čekala. Publikace vznikla na základě práce pracovní skupiny IFCC C-RSE (Committee on Reference Systems for Enzyme) "standardizace enzymů" a prošla oponenturou všech národních odborných společností v rámci IFCC. Tím se konečně uzavřela standardizace všech enzymů, měřených v rámci základního vyšetření krevního séra/plasmy.

Princip měření spočívá v tom, že ALP katalyzuje hydrolyzu 4-nitro-fenyl-fosfátu za vzniku 4-nitro-fenolu a fosfátu. V alkalickém prostředí pak vzniká 4-nitrofenoxidový ion. Pufr AMP slouží k nastavení a udržení hodnoty pH reakční směsi a jako akceptor fosfátu.

Uvádíme stručnou charakteristiku referenčního měřicího postupu ve dvou tabulkách.

Tabulka 1. Reakční podmínky

| | |
|----------------------------------|------------------------------|
| 2-amino-2-metyl-1-propanol (AMP) | 750 mmol.l ⁻¹ |
| pH (37°C) | 10,20 ± 0,05° C ^a |
| 4-nitrofenylfosfát | 16 mmol.l ⁻¹ |
| Síran zinečnatý | 1 mmol.l ⁻¹ |
| Octan hořečnatý | 2 mmol.l ⁻¹ |
| HEDTA | 2 mmol.l ⁻¹ |
| Objemový poměr séra | 0,0196(1/51) |

^a maximální povolená rozšířená nejistota pro 95% interval spolehlivosti

Tabulka 2. Podmínky měření

| | |
|---|---------------------------------|
| Teplota měření | 37°C ± 0,1°C |
| Vlnová délka | 405 nm ± 1 nm ^a |
| Šíře spektrálního pásu (pološířka spektr. pásu) | < 2 nm |
| Tloušťka vrstvy | 10,00 mm ± 0,01 mm ^a |
| Inkubační čas | 60 s |
| Doba od startu do počátku měření (delay time) | 90 s |
| Interval měření | 120 s |
| Počet měřicích bodů | > 6 |

^a maximální povolená rozšířená nejistota pro 95% interval spolehlivosti

Postup měření

K 2 ml reagenčního roztoku, vytemperovaného na 37°C se přidá 50 µl vzorku. Po 60 sekundách se reakce startuje přidáním 500 µl startovacího činidla o teplotě 37°C. Preinkubuje se 90 sekund a následně se měří po dobu 120 sekund absorbance.

Startovací činidlo: 81,6 mmol/l 4-nitrofenylfosfátu
Blank reagentů: 9 g/l NaCl namísto startovacího činidla a vzorku

Blank vzorku: 9g/l NaCl namísto startovacího vzorku

Předběžné referenční intervaly byly stanoveny ve třech regionech (Nancy, Francie; Milán, Itálie; Bursa, Turecko) u populace ve věku 18-50 let.

Muži:

- počet jedinců referenční populace 266
- referenční interval (2,5-97,5 percentil) 0,72-1,92 µkat/l

Ženy:

- počet jedinců referenční populace 257
- referenční interval (2,5-97,5 percentil) 0,55-1,64 µkat/l

Očekávané důsledky standardizace

- plánovaná příprava evropského referenčního materiálu (ERM/IRMM/IFCC) pro stanovení ALP s certifikovanou referenční hodnotou, získanou touto metodou IFCC

- eliminace metody MEG, která poskytuje jiné hodnoty výsledků měření
- podstatné zlepšení mezilaboratorní preciznosti v programech EHK a snížení systematických diferencí mezi výsledky diagnostik různých výrobců, které jsou zatím neúnosně veliké (až kolem 20 %)
- nutnost revalidace hodnot referenčních intervalů (asi jejich snížení)

Literatura:

1. IFCC Scientific Division. Committee on Reference Systems for Enzyme. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentration of enzymes at 37° C. Part 9.: Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alkaline phosphatase. Clin Chem Lab Med 2011;49/9 v tisku.