

Misura dell'attività catalitica della fosfatasi alcalina con N-metil-glucamina (MEG) e ammino-metil-propanolo (AMP) come tamponi: effetti sulla commutabilità dei materiali di controllo

Ferruccio Ceriotti¹, Carlo Alberto Ferrero¹, Elena Guerra¹, Roberto Bonora², Mauro Panteghini² per il Gruppo di Studio "Enzimi" della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC)

¹Diagnostica e Ricerca San Raffaele S.p.A., Milano

²Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dipartimento di Scienze Cliniche "Luigi Sacco", Università degli Studi di Milano, Milano

ABSTRACT

Amino-methyl-propanol (AMP) and N-methyl-glucamine (MEG) buffers for alkaline phosphatase measurement: effects on commutability of control materials

This study compares the effect of the modification of some analytical variables, i.e. pH, buffer concentration, NaCl concentration, and presence/absence of metal ion buffer, in two buffer systems previously recommended for alkaline phosphatase (ALP) determination, i.e. AMP and MEG, to test their robustness and different effects on a wide variety of control materials. Analyses were repeated on the same samples in two laboratories, using different automated analysers (Abbott Aeroset and Roche Hitachi 717) and experimental factors based on the molar absorption coefficient of the 4-nitrophenol to calculate results. Eight human serum pools (HSP) with different prevalence of ALP isoenzymes [normal (n=2), liver (n=2), bone (n=3), and placenta (n=1)] and 12 commercial control materials (CM) were tested. The effects of the variations of analytical conditions were evaluated by calculating the ratio of the results obtained in different conditions on HSP and CM. If CM ratio was within the $\pm 3SD$ interval of the HSP results (excluding the HSP obtained in pregnant women), the CM was considered commutable in that particular condition. All variables had an effect on HSP which was different from that on most CM, showing commutability problems in these materials. However, while pH and NaCl variations produced the same effects with both buffers, variations of buffer concentration and absence of ion buffer caused minor problems with MEG. The majority of the evaluated CM was not commutable since they consist of ALP isoenzymes different from the pattern which is usually detected in cases of liver or bone diseases. In particular, the use of placental or intestinal ALP to spike CM should be discontinued by the manufacturers. Conversely, it would be desirable to use recombinant tissue non-specific ALP to prepare CM.

RIASSUNTO

In questo studio vengono confrontati gli effetti della modificazione di alcune condizioni analitiche (per esempio pH, concentrazione del tampone, concentrazione di NaCl, presenza/assenza di tampone di ioni metallici) in due sistemi tampone (AMP e MEG) precedentemente raccomandati per la determinazione della attività catalitica della fosfatasi alcalina del siero, al fine di verificare la robustezza dei metodi e di definire i diversi effetti su materiali di controllo differenti. Le analisi sui medesimi campioni sono state ripetute in due laboratori, con l'uso di analizzatori automatici diversi (Abbott Aeroset e Roche Hitachi 717), e di fattori sperimentali basati sul coefficiente di assorbimento molare del 4-nitrofenolo per calcolare i risultati. Sono stati esaminati otto miscele di siero umano (HPS) con differente prevalenza di isoenzimi della ALP [normale (n=2), epatica (n=2), ossea (n=3), e placentare (n=1)] e dodici materiali di controllo (CM) commerciali. Gli effetti delle modificazioni di condizione analitica sono stati valutati calcolando il rapporto tra i valori misurati in coppie di differenti condizioni sperimentali per i HSP ed i CM. Se il rapporto per un CM cadeva all'interno dell'intervallo $\pm 3SD$ per i risultati dei HSP (con l'esclusione dei HSP ottenuti da donne gravide), il CM era considerato commutabile nella particolare condizione. La variazione di ciascuna condizione analitica aveva un effetto sui HSP, che risultava differente da quello della maggior parte dei CM, evidenziando quindi problemi di commutabilità per tali materiali. Tuttavia, mentre le modificazioni di pH e di NaCl producevano i medesimi effetti con entrambi i tamponi (AMP e MEG), le variazioni di concentrazione del tampone e la assenza di tampone di ioni metallici causavano minori problemi con il MEG. La maggior parte dei CM valutati appariva non commutabile, poichè essi contengono isoenzimi della ALP in proporzioni differenti da quelle solitamente presenti in caso di malattie epatiche od ossee. In particolare, l'uso di ALP placentare od intestinale per arricchire i CM dovrebbe essere abbandonato dall'industria. Per contro apparirebbe desiderabile l'utilizzo di ALP ricombinante non tessuto-specifica per la preparazione dei CM.

INTRODUZIONE

Numerosi tamponi sono stati proposti per la misura dell'attività catalitica della fosfatasi alcalina (ALP, EC 3.1.3.1) (glicina (1), carbonato (2), dietanolamina (3), AMP (4,5), MEG (6), 2-(etilammino)etanol(7)), ma due di essi sembrano avere riscosso maggiore successo: l'AMP, proposto dalla IFCC come tampone di scelta (8), e il MEG, suggerito dalla SIBioC e dalla Società Tedesca di Chimica Clinica (9-11). Dal momento che ciascuno dei due tamponi ha mostrato vantaggi e svantaggi nei lavori che li hanno valutati, il presente lavoro ha avuto lo scopo di individuare eventuali nuovi elementi in favore della scelta dell'uno o dell'altro. In particolare, l'attenzione è stata focalizzata su uno dei punti più delicati della misura dell'attività catalitica dell'ALP, vale a dire il comportamento durante la misura dei materiali di controllo, che è frequentemente assai diverso da quello dei sieri dei pazienti (questo aspetto è definito come non commutabilità dello specifico materiale). È noto che, mentre diversi metodi e ottimizzazioni analitiche spesso correlano bene quando sono confrontati con la misura di sieri dei pazienti (8,10,12), non si ritrova lo stesso tipo di correlazione quando si analizzano campioni di controllo liofilizzati o comunque pretrattati. Questi ultimi sono generalmente più sensibili a piccole variazioni delle condizioni analitiche (13,14). I possibili motivi di non commutabilità dei materiali nella misura dell'ALP sono stati identificati nella deplezione di zinco, che avviene durante il processo di purificazione degli enzimi usati per arricchire i sieri di controllo (15), oppure nell'origine non umana degli enzimi aggiunti per aumentare la concentrazione enzimatica (16). Dal momento che i calibratori ed i materiali di controllo sono un elemento essenziale nel sistema di riferimento basato sulla riferibilità metrologica, un metodo di misura che annullasse o rendesse meno evidenti i possibili limiti dei materiali di controllo sarebbe da preferire (17). Si è quindi, in specifico, valutato se l'uso del tampone AMP piuttosto che del tampone MEG può influenzare o no la commutabilità di tali materiali. Allo scopo sono state leggermente modificate le condizioni di misura dell'enzima con i due tamponi per saggiare gli effetti di queste variazioni su 12 diversi materiali di controllo in confronto con 8 pool di sieri umani (HSP) a composizione isoenzimatica nota. Le variazioni delle condizioni analitiche hanno riguardato il pH e la concentrazione del tampone, la concentrazione di NaCl e la presenza o meno del tampone di ioni metallici.

MATERIALI E METODI

Campioni

Gli HSP erano preparati selezionando dai campioni residui dopo l'effettuazione delle analisi richieste quelli appartenenti a pazienti con patologie epatiche ed ossee, bambini, donne in gravidanza e individui apparentemente sani non affetti da alcun tipo di patologia evidente. Dopo la preparazione e l'aliquotazione, gli HSP erano conservati a -70 °C fino al momento dell'uso. I materiali di controllo,

da 4 diversi produttori, erano scelti in rappresentanza delle differenti tipologie di materiali di controllo disponibili (liofili, congelati o liquidi).

La composizione isoenzimatica degli HSP e dei materiali di controllo studiati era valutata mediante procedura elettroforetica e specifica colorazione per l'ALP, effettuata dopo pretrattamento del campione con neuraminidasi per 15 min, e lettura densitometrica dei tracciati (18). La Tabella 1 riporta le caratteristiche di tutti i campioni utilizzati.

Strumentazione e condizioni analitiche

Le determinazioni di ALP erano eseguite su due analizzatori automatici: Abbott Aeroset (laboratorio 1) e Roche Hitachi 717 (laboratorio 2). Con lo scopo di ottenere risultati omogenei nei due laboratori, il coefficiente di assorbimento molare del 4-nitrofenolo era ottenuto sperimentalmente su ciascuno dei due analizzatori. A tal fine, una soluzione 0,04 mmol/L di 4-nitrofenolo in tampone MEG era preparata secondo quanto indicato da Bessey et al. (1). Misure duplicate in due diversi esperimenti erano eseguite sia su uno spettrofotometro di riferimento che sulle due strumentazioni automatiche utilizzate. La media dei risultati ottenuti era poi utilizzata per calcolare i fattori utilizzati per calcolare le attività enzimatiche nello studio.

Erano effettuati quattro esperimenti, ciascuno con entrambe i tamponi (AMP e MEG): 1. presenza o assenza di tampone ionico; 2. effetto della molarità del tampone: 350, 500 o 700 mmol/L; 3. effetto della concentrazione di NaCl: 0, 55 o 110 mmol/L; 4. variazioni del pH di misura: $\pm 0,5$ unità di pH rispetto all'ottimale.

Con il tampone AMP, come condizioni analitiche di riferimento erano adottate quelle indicate dalla IFCC (8), ma con tre modificazioni della procedura originale: temperatura di esecuzione a 37 °C, concentrazione di 4-nitrofenilfosfato di 20 mmol/L (invece di 16 mmol/L) ed uso del substrato come starter invece del campione.

Come condizioni di riferimento per il metodo utilizzando il tampone MEG erano adottate quelle proposte dalla Società Tedesca di Chimica Clinica (10), ma con un rapporto campione/reattivo di 1:51 invece di 1:56.

I dettagli delle condizioni analitiche sono mostrati nella Tabella 2.

Tutti i campioni erano misurati in triplicato per ogni condizione analitica per ciascun tampone. Tutti gli esperimenti erano ripetuti nei due laboratori partecipanti allo studio.

Elaborazione dati

I risultati dei due centri partecipanti erano accorpati in fase di elaborazione; ciascun risultato finale è quindi costituito dalla media di 6 misurazioni (3 per laboratorio), con alcune eccezioni indicate qui di seguito. Erano eliminati i seguenti set di dati: esperimento 2. (effetto della concentrazione dei tamponi), tampone AMP, dati del laboratorio 1 (dati incongruenti con laboratorio 2 e con le informazioni rinvenibili in letteratura); esperimento 4. (effetto del pH tampone) tampone AMP, dati del laboratorio 1 (dati incongruenti con laboratorio 2 e con le informazioni della lette-

Tabella 1*Caratteristiche dei materiali utilizzati*

Materiale	Origine ALP	Attività ALP, U/L*	Componenti molecolari ALP
HSP1 (normale)	Pool umano	65	Epatica 54%, Ossea 46%
HSP2 (normale)	Pool umano	91	Epatica 38%, Ossea 52%, Intestinale 10%
HSP3 (fegato)	Pool umano	315	Epatica (I+II) 93%, Ossea 7%
HSP4 (fegato)	Pool umano	212	Epatica 79%, Ossea 21%
HSP5 (osso)	Pool umano	519	Epatica 7%, Ossea 93%
HSP6 (osso)	Pool umano	233	Epatica 14%, Ossea 86%
HSP7 (osso)	Pool umano (bambini)	245	Epatica 12%, Ossea 88%
HSP8 (placenta)	Pool umano (gravide)	177	Epatica 18%, Placentare (ossea) 82%
Bio-Rad BioRlyo 1**	Pool umano addizionato con ALP bovina	142	Epatica, Intestinale (prevalente)
Bio-Rad BioRlyo 2**	Pool umano addizionato con ALP bovina	225	Epatica, Ossea, Intestinale (prevalente)
Bio-Rad 1**	?	74	Epatica, Ossea, Intestinale (prevalente)
Bio-Rad 2**	?	359	Epatica, Ossea, Intestinale (prevalente)
Roche Precinorm**	ALP placentare ricombinante	93	Epatica, Ossea, Placentare (a migrazione simil-intestinale) (prevalente)
Roche Precipath**	ALP placentare ricombinante	225	Epatica, Placentare (prevalente)
Roche C.F.A.S.**	ALP placentare ricombinante	226	Epatica, Ossea, Placentare (a migrazione simil-intestinale) (prevalente)
Beckman Decision 1****	Bovina	38	Intestinale
Beckman Decision 2****	Bovina	156	Intestinale
Beckman Decision 3****	Bovina	273	Intestinale
Ortho 1**	?	99	Ossea, Intestinale
Ortho 2**	?	336	Epatica, Ossea, Intestinale (prevalente)

HSP, pool di sieri umani; ALP, fosfatasi alcalina.

* misurata con metodo in ref. 8 a 37 °C; ** materiale liofilizzato; *** materiale congelato; **** materiale liquido

Tabella 2*Composizione dei reattivi e condizioni di reazione*

	Reattivo AMP	Reattivo MEG
<i>Tampone</i>	2-amino-2-metil-1-propanolo (base libera) 350, 500, 700 mmol/L	N-metil-D-glucamina 500, 350, 700 mmol/L
<i>pH</i>	10 - 40 - 9,9 - 10,9 (a 30°C)	10,1 - 9,6 - 10,6 (a 37°C)
<i>4-nitrofenilfosfato</i>	20 mmol/L	20 mmol/L
<i>Cloruro di sodio</i>	0 - 55 - 110 mmol/L	110 - 55, 0 mmol/L
<i>Acetato di magnesio</i>	2,0 - 0,5 mmol/L	0,5 - 2,0 mmol/L
<i>Solfato di zinco</i>	1,0 - 0 mmol/L	0 - 1,0 mmol/L
<i>Acido N-Idrossietilendiammino-triacetico (HEDTA)</i>	2,0 - 0 mmol/L	0 - 2,0 mmol/L
Frazione di volume del campione	0,0196 (1:51)	0,0196 (1:51)
Temperatura	37°C	37°C
Tempo di preincubazione	300 sec	300 sec
Starter	4-nitrofenilfosfato	4-nitrofenilfosfato
Tempo di attesa	60 sec	60 sec
Tempo di misura	90 sec	90 sec

In corsivo: condizioni modificate durante gli esperimenti.**In grassetto**: condizioni di riferimento (8,10)

ratura); esperimento 4. tampone MEG, dati del laboratorio 2 (assenza di NaCl nella miscela di reazione). Nessun dato era eliminato negli esperimenti 1. e 3..

Valutazione della commutabilità dei materiali

La commutabilità dei materiali studiati era valutata in due diversi modi:

1. secondo Eckfeld (19). Il valore di confronto $x - y$ (dove x e y sono i risultati di ALP ottenuti nelle due condizioni analitiche confrontate) era calcolato utilizzando i risultati dei 7 HSP (escludendo HSP8); i materiali di controllo erano considerati commutabili se i loro risultati cadevano entro l'area definita dall'intervallo di confidenza al 95% rispetto alla retta calcolata interpolando i valori di $x - y$ ottenuti sui 7 HSP (un esempio di questo tipo di valutazione è presentato in Fig. 1);

2. secondo Moss (20). Il rapporto numerico fra l'attività di ALP, misurata nelle due condizioni analitiche a confronto, ottenuto per i materiali di controllo era confrontato con il rapporto medio ottenuto sui 7 HSP (sempre escludendo HSP8). Come limite di accettabilità era considerato il rapporto medio dei 7 HSP $\pm 3DS$.

RISULTATI

Determinazione del coefficiente di assorbimento molare del 4-nitrofenolo

I risultati ottenuti erano $1702,5 \text{ m}^2 \text{ mol}^{-1}$ per l'analizzatore Aeroset (lunghezza d'onda, 404 nm; $n=4$, range 1694,2-1713,0) e $1662,2 \text{ m}^2 \text{ mol}^{-1}$ per l'analizzatore Hitachi 717 (lunghezza d'onda, 405 - 700 nm; $n=4$, range 1645,8 - 1677,3). Al fine di verificare che le condizioni sperimentali fossero rispettate e sovrapponibili nei due laboratori, i coefficienti di assorbimento erano anche otte-

nuti su spettrofotometri di riferimento a 405 nm in entrambi i centri partecipanti e confrontati tra loro. I risultati ottenuti erano $1871,4 \text{ m}^2 \text{ mol}^{-1}$ ($n=4$, range 1869,5-1873,3) per il laboratorio 1 e $1867,4 \text{ m}^2 \text{ mol}^{-1}$ ($n=4$, range 1856,5 - 1876,3) per il laboratorio 2, con un'ottima comparabilità sia tra i risultati stessi che con i dati presenti in letteratura (8,10).

Esperimento 1. Presenza / assenza del tampone di ioni metallici

I risultati sono mostrati nelle Figure 1 e 2 e riassunti nella Tabella 3.

L'aggiunta del tampone ionico causava un incremento dell'attività catalitica dell'ALP molto modesto per tutti gli HSP con entrambi i tipi di tampone (tra +0.7% e +3.2% per AMP e tra +0.6% e +2.0% per MEG), mentre gli effetti sui materiali di controllo apparivano molto più marcati (incremento di attività compreso tra +4.9% e +17.7% per AMP e tra +0.5% e +11% per MEG). Usando la modalità di valutazione della commutabilità secondo Moss, nessun materiale di controllo appariva comportarsi come gli HSP quando si impiegava il tampone AMP e solo 3 materiali quando si usava il tampone MEG.

Esperimento 2. Effetto della molarità dei tamponi

I risultati sono mostrati nelle Figure 3 e 4 e nella Tabella 3. In questo caso la situazione appare diversa per i due tamponi. Nel caso del tampone AMP, come peraltro ben

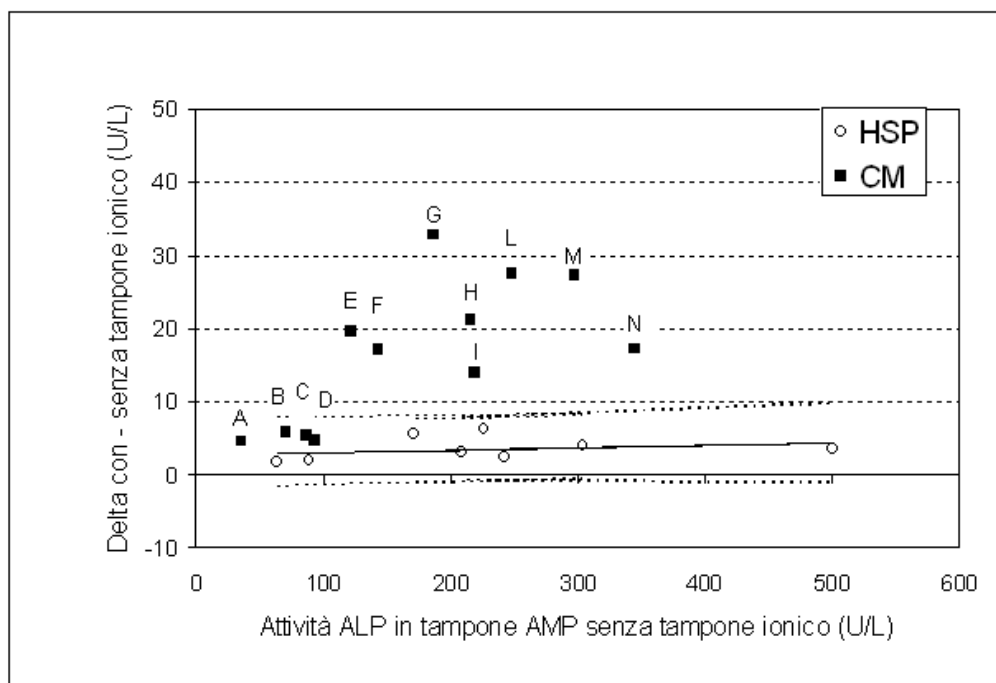


Figura 1

Esperimento 1. Valutazione dell'effetto della presenza del tampone ionico sulla commutabilità di materiali di controllo (CM) [quadrati pieni]. Le differenze assolute tra i risultati di ALP ottenuti con tampone AMP in presenza ed in assenza di tampone ionico sono poste in grafico rispetto alle attività di ALP (ottenute in tampone AMP senza tampone ionico). La retta di regressione e gli intervalli di confidenza al 95% sono calcolati con i risultati ottenuti nei pool di sieri congelati (HSP) escluso HSP8 [cerchi vuoti].

Le lettere identificano i vari materiali: A = Beckman 1, B = BioRad 1, C = Ortho 1, D = Precinorm, E = BioRlyo 1, F = Beckman 2, G = BioRlyo 2, H = Cfes, I = Precipath, L = Beckman 3, M = Ortho 2, N = BioRad 2

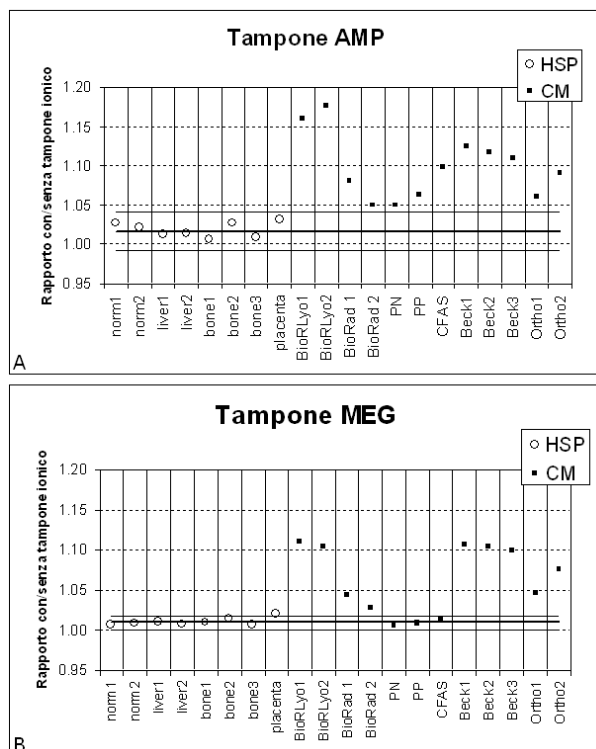


Figura 2
 Esperimento 1. Confronto fra reattivi con e senza tampone ionico. In A sono rappresentati i rapporti fra i risultati di attività di ALP in un reattivo con tampone AMP ottenuti in presenza ed in assenza di tampone ionico per i pool di sieri congelati (HSP) [cerchi vuoti] ed i materiali di controllo (CM) [quadrati pieni]. Le linee indicano la media dei rapporti ottenuti sui HSP (HSP8 escluso) [linea spessa] e rispettivamente la media +3DS e -3DS. In B sono rappresentati i risultati ottenuti nelle stesse condizioni, ma con tampone MEG.

noto dalla letteratura (8), l'attività ALP aumentava in modo sensibile al crescere della molarità del tampone (~2% ogni 100 mmol/L) per tutti gli HSP contenenti isoenzimi tessuto-specifici (osseo/epatico), mentre tendeva a ridursi significativamente nel caso di presenza di ALP di origine placentare. Nel caso del tampone MEG, non si evidenziava invece alcun aumento dell'attività ALP, con HSP8 che si comportava in modo analogo agli altri HSP. Ancora una volta, almeno con la modalità di valutazione di Moss, il tampone MEG mostrava un numero di materiali di controllo commutabili superiore all'AMP (Tabella 3).

Esperimento 3. Effetto della concentrazione di NaCl

Per ciascun tipo di tampone, 2 diverse concentrazioni di NaCl erano confrontate con la formulazione originale. I risultati sono mostrati nelle Figure 5 e 6 e nella Tabella 3.

La situazione appare simile per i due tamponi, anche se si presenta in modo speculare, poiché la formulazione base del reattivo con tampone MEG prevede l'impiego di NaCl mentre quella con AMP non lo prevede (8,10). La presenza di NaCl incrementava l'attività catalitica dell'ALP

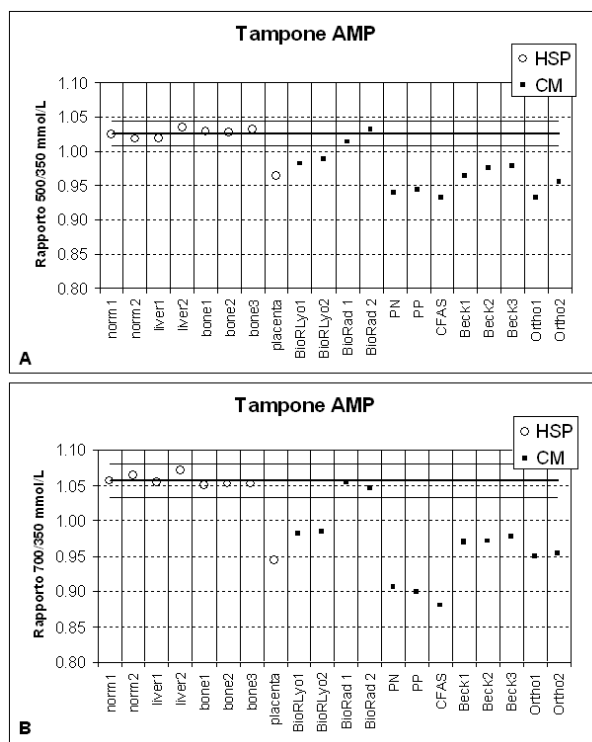


Figura 3
 Esperimento 2. Confronto fra reattivi con tampone AMP a diversa concentrazione. Simboli come in Figura 2.

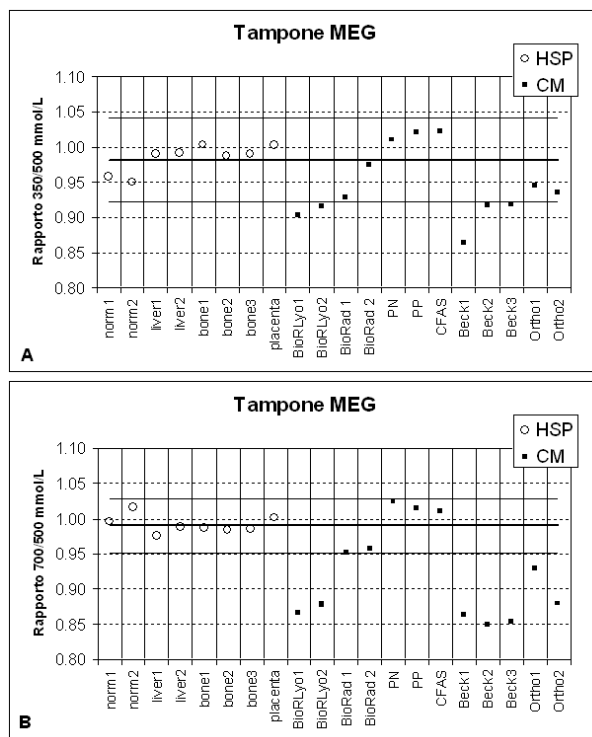


Figura 4
 Esperimento 2. Confronto fra reattivi con tampone MEG a diversa concentrazione. Simboli come in Figura 2.

Tabella 3

Riassunto dei risultati della commutabilità dei materiali di controllo nei vari esperimenti effettuati. Sono indicati il numero dei materiali di controllo (sui 12 esaminati) che sono risultati commutabili in relazione alla due modalità di valutazione utilizzate

Condizione sperimentale indagata		Tampone AMP		Tampone MEG	
		Criterio Eckfeld	Criterio Moss	Criterio Eckfeld	Criterio Moss
1. Effetto del tampone di ioni metallici	Presenza/assenza	4	0	4	3
2. Effetto della concentrazione del tampone*	Confronto A/B	3	2	3	7
	Confronto A/C	2	2	2	5
3. Effetto del NaCl**	Confronto A/B	5	3	2	6
	Confronto A/C	2	2	4	3
4. Effetto del pH del tampone***	Confronto A/B	2	2	3	2
	Confronto A/C	4	2	4	2

*Esperimento 2:

per AMP: A = 350 mmol/L, B = 500 mmol/L, C = 700 mmol/L

per MEG: A = 500 mmol/L, B = 350 mmol/L, C = 700 mmol/L

**Esperimento 3:

per AMP: A = assenza di NaCl, B = 55 mmol/L di NaCl, C = 110 mmol/L di NaCl

per MEG: A = 110 mmol/L di NaCl, B = 55 mmol/L di NaCl, C = assenza di NaCl

***Esperimento 4:

per AMP: A = tampone pH 10,4, B = tampone pH 9,9, C = tampone pH 10,9

per MEG: A = tampone pH 10,1, B = tampone pH 9,6, C = tampone pH 10,4

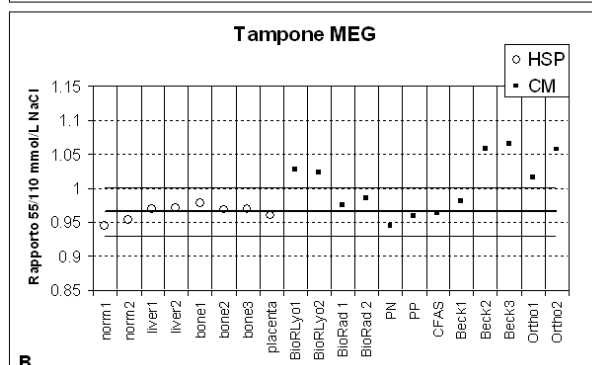
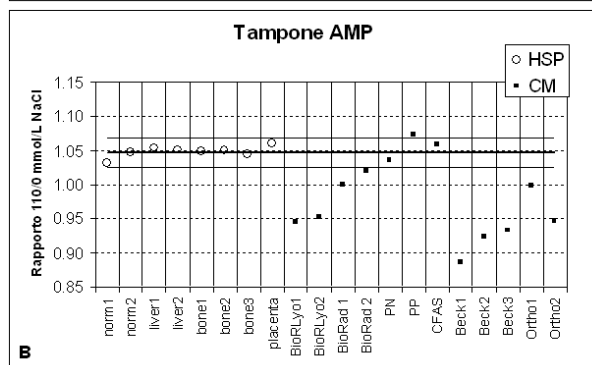
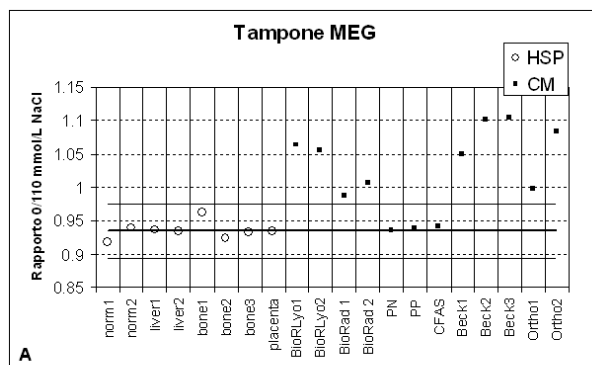
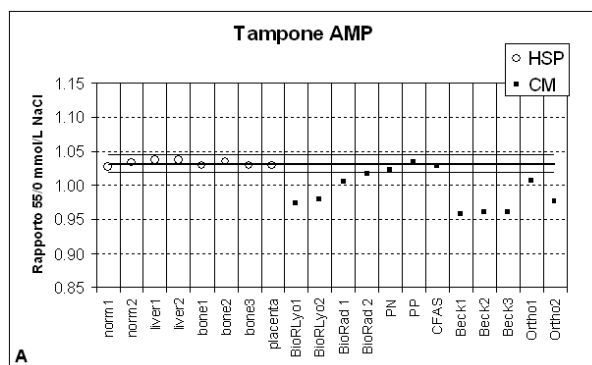


Figura 5
Esperimento 3. Confronto fra reattivi con tampone AMP a diverso contenuto di NaCl. Simboli come in Figura 2.

Figura 6
Esperimento 3. Confronto fra reattivi con tampone MEG a diverso contenuto di NaCl. Simboli come in Figura 2.

(in media di circa il 5% per una concentrazione di 110 mmol/L) in modo simile per i due tamponi e per i vari HSP, ma in modo significativamente diverso per i materiali contenenti ALP di origine non umana, causando la non commutabilità della maggior parte di essi.

Esperimento 4. Effetti delle variazioni del pH del tampone

Per ciascun tampone erano approntati reattivi con pH rispettivamente di 0,5 unità inferiore e 0,5 unità superiore a quello ottimale, che è rispettivamente di 10,4 (a 30 °C) per il tampone AMP e 10,1 (a 37 °C) per il tampone MEG. Nel caso del tampone AMP, l'attività dell'ALP diminuiva in media del 30% passando da pH 10,4 a pH 9,9, mantenendosi invece praticamente inalterata passando da pH 10,4 a 10,9, con l'esclusione di HSP8, la cui attività continuava ad aumentare col crescere del pH (Figura 7). Il comportamento dei materiali di controllo appariva invece molto differente in funzione della loro composizione. Si può tuttavia rilevare come i materiali Roche contenenti ALP placentare di tipo ricombinante si comportavano tendenzialmente come HSP8, ottenuto da donne gravide (Figura 8A). Nel caso del tampone MEG, la variazione del pH del reattivo mostrava un effetto meno rilevante, con una diminuzione media di attività ALP di circa il 15% passando da pH 10,1 a 9,6 ed un decremento di circa il 10% passando da pH 10,1 a pH 10,6 (Figura 9). Ancora una volta, tuttavia, HSP8, come nel caso del tampone AMP, mostrava un

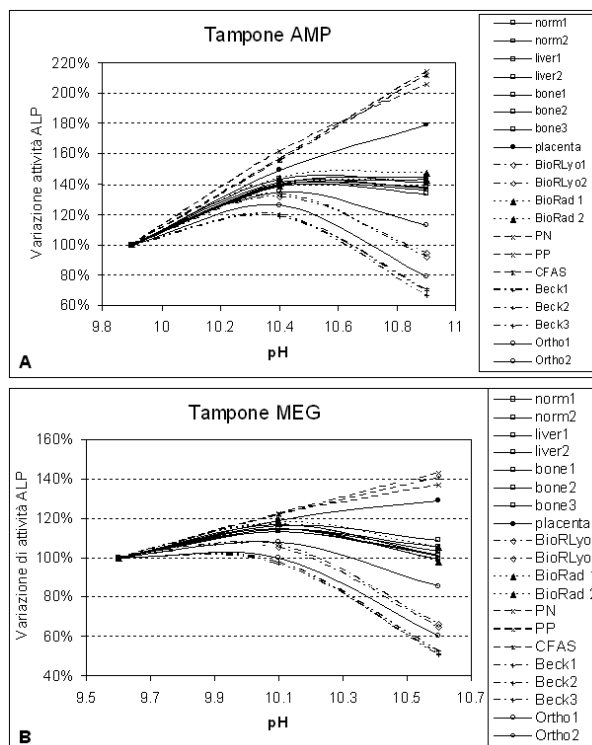


Figura 8
Esperimento 4. Variazione dell'attività ALP nei materiali testati in funzione del pH del tampone: A) reattivo con tampone AMP, B) reattivo con tampone MEG.

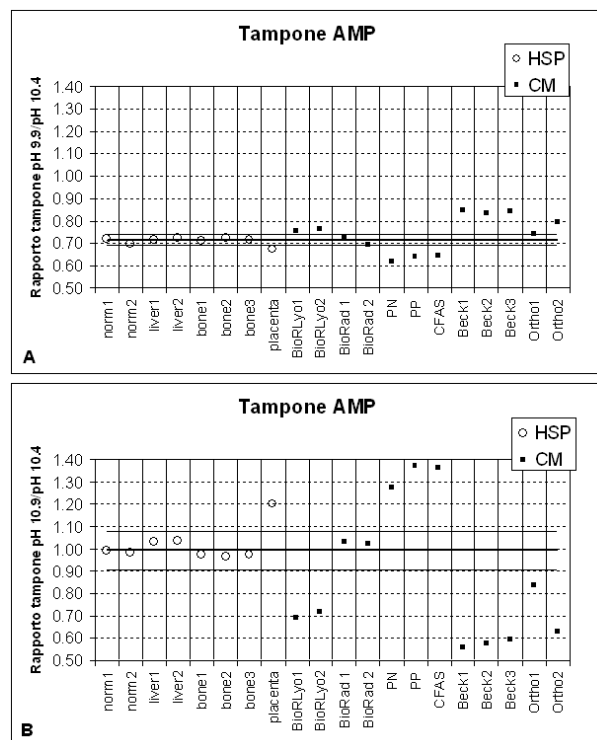


Figura 7
Esperimento 4. Confronto fra reattivi con tampone AMP a diverso pH. Simboli come in Figura 2.

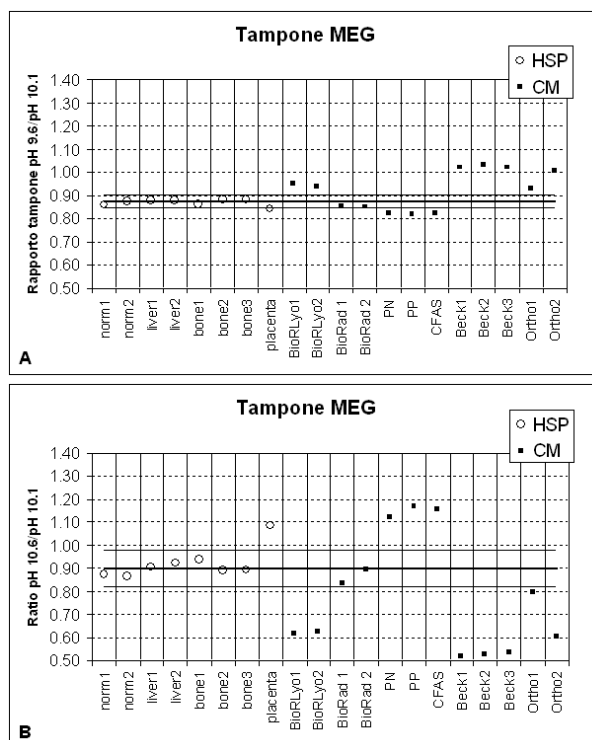


Figura 9
Esperimento 4. Confronto fra reattivi con tampone MEG a diverso pH. Simboli come in Figura 2.

incremento continuo dell'attività al crescere del pH, che specularmente veniva riprodotto dai materiali Roche a componente placentare (Figura 8B). L'effetto sulla commutabilità dei materiali di controllo appariva analogo per i 2 tamponi (Tabella 3).

DISCUSSIONE

Complessivamente, i dati ottenuti nel presente lavoro dimostrano che qualsiasi variazione, anche minima, introdotta nel metodo analitico impiegato comporta effetti rilevanti sulla misura dell'attività dell'ALP nei materiali di controllo presenti in commercio, effetti che sono dipendenti dal tipo di ALP con cui sono stati arricchiti. Infatti, mentre i materiali congelati BioRad si comportavano in modo sostanzialmente simile agli HSP quando erano modificati pH e molarità del tampone, i materiali Roche (contenenti ALP placentare ricombinante) si comportavano in modo analogo agli HSP solo in limitate condizioni (per es. al variare delle concentrazioni di NaCl con il tampone AMP). I materiali Ortho e Beckman, la cui composizione in termini di ALP è di fatto molto diversa da quella del siero umano, mostravano un comportamento commutabile in una sola occasione (tampone MEG, rapporto concentrazione tampone 350/500 mmol/L per Ortho 1 e 2, e tampone MEG, confronto reattivo con NaCl 55 vs 110 mmol/L per Beckman Decision 1), rispondendo mediamente a tutte le variazioni apportate ai due metodi analitici in modo significativamente differente dai sieri umani.

Riguardo all'influenza dei due tipi di tampone sulla commutabilità dei materiali, si può complessivamente evidenziare una lieve superiorità del tampone MEG (soprattutto se la commutabilità è valutata con il metodo dei rapporti delle attività enzimatiche sec. Moss) per due caratteristiche specifiche: il minore effetto dell'assenza del tampone a ioni metallici e la scarsa influenza della concentrazione del MEG utilizzata, in particolare sulla misura dell'isoenzima placentare. Questi due aspetti spiegano il differente comportamento dei materiali Roche con i due tamponi AMP e MEG.

Meritano infine un commento le differenze nei risultati ottenuti con i due diversi modi di valutazione della commutabilità, tipico l'esempio dell'effetto della presenza o meno del tampone ionico nel reattivo con tampone AMP presentato nella Tabella 3. In questo caso, se la commutabilità era valutata come proposto da Eckfeld (19), 4 materiali su 12 erano commutabili con entrambi i tamponi, mentre addirittura nessun materiale era commutabile con il tampone AMP se si utilizzava il metodo di valutazione proposto da Moss (20). Al contrario, nel caso delle variazioni della concentrazione del tampone MEG o del NaCl (sempre in tampone MEG), i materiali giudicati commutabili dal metodo di Moss erano in numero superiore rispetto a quelli valutati con il metodo di Eckfeld. Queste differenze possono essere spiegate dal fatto che quest'ultimo approccio valuta le differenze di attività assolute, che tendono ad essere piccole quando la concentrazione dell'attività catalitica è più bassa (vedi l'esempio della Figura 1, dove

i soli materiali commutabili sono quelli a concentrazione fisiologica), essendo quindi esso particolarmente sensibile alle variazioni mostrate dai materiali a concentrazione elevata. Al contrario, nel metodo dei rapporti proposto da Moss, la valutazione dello scostamento dal comportamento dei sieri umani è valutata con un criterio proporzionale all'opposto più sensibile a variazioni nei materiali a bassa concentrazione. Complessivamente, se si osservano i risultati della valutazione della commutabilità con il metodo di Eckfeld, troviamo che questa era dimostrata in 22 casi sui 72 totali (30,5%), sia con il tampone AMP che con il tampone MEG. Se, invece, si valuta la commutabilità con il metodo di Moss, si dimostravano 13 casi di commutabilità su 72 con il tampone AMP (18%) e 28 con il tampone MEG (38,9%). In quest'ultimo caso, la differenza tra il numero di materiali commutabili nelle due condizioni sperimentali era significativamente diversa (chi quadrato, 6,68; $p = 0,0097$), dimostrando un migliore comportamento dei materiali di controllo commerciali nel sistema di reazione utilizzando MEG.

In conclusione, questo lavoro conferma la difficoltà di disporre di materiali di controllo e calibrazione commerciali per la misura dell'ALP che siano commutabili con i sieri umani. La maggior parte dei materiali esaminati, a contenuto isoenzimatico qualitativamente diverso dal siero umano, si è infatti dimostrata sensibile anche a modeste variazioni delle condizioni di misura rispetto a HSP congelati, anche a vario contenuto isoenzimatico. In particolare, occorre rilevare che l'impiego di ALP di origine intestinale (prevalentemente bovina) o placentare (di tipo ricombinante) dovrebbe essere completamente abbandonato dalle ditte che producono i materiali di controllo ed essere sostituito dall'uso di forme molecolari dell'enzima più simili a quelle ritrovabili in fisiopatologia (es. ALP tessuto aspecifica).

Si può anche affermare che, seppure il tampone MEG tenda a rendere questi comportamenti anomali dei materiali di controllo un po' meno evidenti, le differenze fra questo tampone e l'AMP sono complessivamente abbastanza modeste e, probabilmente, tali da non indurre la comunità scientifica internazionale ed il Comitato per i Sistemi di Riferimento in Enzimologia (C-RSE) dell'IFCC a modificare il tipo di tampone utilizzato nel metodo di riferimento, che è, come noto, rappresentato dall'AMP (8).

REFERENCES

1. Bessey OA, Lowry OH, Brock MJ. A method for rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem* 1946;164:321-9.
2. Moss DW. A note on the spectrophotometric estimation of alkaline phosphatase activity. *Enzymologia* 1966;31:193-202.
3. Recommendations of the German Society for Clinical Chemistry. Standard method for determination of alkaline phosphatase (AP) activity. *Z Clin Chem Klin Biochem* 1972;10:290.
4. *Enzymologie courante en chimie clinique et recommandation pour la mesure des activités catalytiques dans le serum a 30°C.* Société Française de Biologie Clinique. Commis-

- sion Enzymologie. *Ann Biol Clin* 1977;35:271-3.
5. Alkaline phosphatase study group of the subcommittee on enzymes of the American Association for Clinical Chemistry. Selection of reaction conditions for the measurement of alkaline phosphatase activity. In: Second international symposium on Clinical Enzymology (Tietz NW, Weinstock A, Rodgerson D eds.) American Association for Clinical Chemistry, Washington D.C. 1976; pp 51-66.
 6. Chromy V, Zahrandnicek L, Vozmicek J. Use of N-methyl-D-glucamine as buffer in the determination of serum alkaline phosphatase activity. *Clin Chem* 1981;27:1729-32.
 7. Japanese Society of Clinical Chemistry. Recommendations for measuring alkaline phosphatase activity in human serum. *Jpn J Clin Chem* 1990;19:209-27 (in Japanese).
 8. Tietz N, Rinker AD, Shaw LM. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 5. IFCC method for alkaline phosphatase. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983;21:731-48.
 9. Ceriotti G, Bonvicini P, Ceriotti F, Franzini C, Prencipe L, Spandrio L. Valutazione di un metodo per la determinazione della fosfatasi alcalina (ALP) con il tampone N-metilglucamina (MEG). Proposta del suo uso come metodo raccomandato. *Giorn It Chim Clin* 1984;9:167-81.
 10. German Society for Clinical Chemistry, Working group on enzymes. Proposal of standard methods for the determination of enzyme catalytic concentrations in serum and plasma at 37°C 1. Alkaline phosphatase. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992;30:247-56.
 11. Ceriotti F, Ferrero CA, Panteghini M, Prencipe L, Vernocchi A. SIBioC Commissione 04 Enzimi. Raccomandazioni per la determinazione della concentrazione dell'attività catalitica di cinque enzimi. *Biochim Clin* 1994;18:447-62.
 12. Copeland WH, Nealon DA, Rej R. Effects of temperature on measurement of alkaline phosphatase activity. *Clin Chem* 1985;31:185-90.
 13. Lim CW, Vallis LM, Chisnall WN. Alkaline phosphatase activities in fresh serum and lyophilized controls by the AACC reference method or IFCC method compared with that of Bowers and McComb. *Clin Chem* 1986;32:2205.
 14. Masson P, Holmgren J. Comparative study of alkaline phosphatase in human and animal samples using methods based on AMP and DEA buffers: effects on quality control. *Scand J Clin Lab Invest* 1992;52:773-5.
 15. Tietz NW. Probable source of discrepancies in alkaline phosphatase assay. *Clin Chem* 1987;33:625.
 16. O'Leary N, Pembroke A, Duggan FP. Differences between alkaline phosphatase activities in serum and lyophilized controls in AMP buffer explained. *Clin Chem* 1989;35:510.
 17. Panteghini M, Ceriotti F. Establishing a reference system in clinical enzymology. *Biochim Clin* 2000;24:499-508.
 18. Panteghini M, Bais R, van Solinge WW. Alkaline phosphatase. In: Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, eds. Elsevier Saunders: St. Louis, 2006:607-11.
 19. Eckfeld JH, Copeland KR. Accuracy verification and identification of matrix effects. The College of American Pathologists' protocol. *Arch Pathol Lab Med* 1993;117:381-6.
 20. ECCLS Document "Standard for enzyme calibration materials and control materials". 1988