

«ПОГОДЖЕНО»

В.о. Голови Державної служби лікарських засобів та виробів медичного призначення
І.Б. Демченко 29 серпня 2008р.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Головний лікар клінічної лікарні
„Феофанія” Державного управління справами
І.П. Семенів 28 серпня 2008р.

Код за НК 024:2019 – **33165**

REF № **HP016.03**

ТУ У **24.4-24607793-017-2003**

ІНСТРУКЦІЯ ДО НАБОРУ РЕАКТИВІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ЛУЖНОЇ ФОСФАТАЗИ В СИРОВАТЦІ КРОВІ (КІНЕТИЧНИЙ МЕТОД З АМП-БУФЕРОМ)

ПРИЗНАЧЕННЯ

IVD

Набір застосовується для визначення активності лужної фосфатази в сироватці крові людини з п-нітрофенілфосфатом натрію *кінетичним методом з АМП-буфером* в клініко-діагностичних, біохімічних лабораторіях та науково-дослідницькій практиці.

Набір розрахований на **12 макро-, 25 напівмікро- або 50 мікрОВизначень** активності лужної фосфатази (Див. *Примітку 3*).

Діапазон визначаємих активностей – від 6 МОд/л до 1200 МОд/л.

Лінійність методу повинна зберігатися до швидкості зміни оптичної щільності (ΔЕ/хв) 0,25.

Коефіцієнт варіації визначення - не більше 7 %.

Чутливість ⁵ на 0,001 од. оптичної щільності/хв – **не більше 3,5 МОд/л (405 нм)**.

Зберігання набору - при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С.

Гарантійний термін придатності – 12 місяців від дня виготовлення.

Набір призначений для застосування *in vitro* **тільки кваліфікованим лабораторним персоналом**.

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Лужна фосфатаза каталізує розщеплення п-нітрофенілфосфата в слабо лужному середовищі 2-аміно-2-метил-1-пропанола звільняючи п-нітрофенол. Кількість п-нітрофенола, що утворився в одиницю часу, пропорційна активності ферменту і визначається по зміні оптичної щільності розчину зразка в одиницю часу при довжині хвилі 405 нм.

п-Нітрофенілфосфат + вода → Лужна фосфатаза → п-Нітрофенол + фосфат

Метод рекомендований Міжнародною федерацією по клінічній хімії (IFCC).

СКЛАД НАБОРУ

1. АМП-буферний розчин: – 1 флакон з (40 ± 1) мл;
- 2-аміно-2-метил-1-пропанол - (150,0 ± 7,5) ммоль/л,
2. Субстрат (п-нітрофенілфосфат): – 1 флакон з (10,0 ± 0,5) мл.

ЗРАЗОК ДЛЯ АНАЛІЗУ

Сироватка, гепаринізована плазма. Використовуйте негемолізовану сироватку, відокремлену від згустка щонайшвидше.

У сироватці лужна фосфатаза стабільна 48 годин при температурі від плюс 2°С до плюс 8 °С. Заморожування зразків неприпустимо.

ОБЛАДНАННЯ

1. Фотометричне обладнання, яке здатне вимірювати оптичну щільність розчинів при довжині хвилі **405 нм** у діапазоні (0-1,0) од. опт. щільності та довжині оптичного шляху 10 мм. **(Можливо використання автоматичного аналізатора. Інструкція для автоматичного аналізатора висилається за замовленням споживача).**
2. Водяний термостат або баня, яка забезпечує інкубацію пробірок при температурі плюс (37±0,1) °С.
3. Піпетки місткістю 1, 0.1 та 5 мл (**ДСТУ EN ISO 835:2018**).

ПРИГОТУВАННЯ РОБОЧИХ РОЗЧИНІВ

Субстратно-буферний розчин. Змішати 4 частини буферного розчину із 1 частиною розчину субстрату п-нітрофенілфосфату. Зберігайте Субстратно-буферний розчин завжди щільно закритим в темряві. Розчин стійкий при зберіганні в холодильнику протягом 10 діб (при температурі від плюс 2°С до плюс 8°С).

ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

Витрату реактивів можна масштабувати, виходячи з постійного співвідношення **Субстратно-буферний розчин : Аналізуємий розчин = 50 : 1** (напр. 2,5 мл **Субстратно-буферний розчин** + 0,05 мл сироватки).

Витримати Субстратно-буферний розчин до вибраної температури проведення аналізу **3 хв** в кюветі. Введіть аналізуємий матеріал в **Субстратно-буферний розчин**, ретельно перемішайте та через **1 хв** зчитуйте змінення екстинції з інтервалом **1 хв** (або через інші рівні проміжки часу) на протязі **3 хв** по відношенню до повітря. Розрахуйте середнє змінення екстинції за **1 хв**. ($\Delta E/xv$). Якщо $\Delta E/xv$ перевищує 0,250/xv при фотометруванні або кінетична крива втрачає лінійність, розведіть зразок в 10 разів фізрозчином, виконайте вимірювання проби знов та результат помножте на 10.

Фотометрування - див. розділ «Обладнання».

РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Розрахунок активності лужної фосфатази ведуть по формулі (1).

в міжнародних одиницях: [МОд/л] [мкмоль/хв × л],

$$C = 2757 \times \Delta E/xv \quad (1)$$

* фактор перерахування одиниць 1 МОд/л = 16,67 нмоль/(с×л) = 0,01667 μ кат/л

РЕФЕРЕНТНІ ВЕЛИЧИНИ

Дорослі ³

	37°C, МОд/л	30°C, МОд/л
Чоловіки, 20- 50 рік	53 - 128	38 – 94
Чоловіки, > 60 рік	56 – 119	43 – 88
Жінки, 20- 50 рік	42 - 98	28 –78
Жінки,> 60 рік	53 – 141	40 – 111

Діти ⁴, 37 °C

Вік	Жінки, МОд/л	Чоловіки, МОд/л
1 – 30 діб	48 – 406	75 – 319
1 місяц– 1 рік	124 – 341	82 – 383
1 – 3 років	108 - 317	104 – 345
4 – 6 років	96 – 297	93 – 309
7 –9 років	69 – 325	86 – 315
10 – 12 років	51 – 332	42 – 362
13 – 15 років	50 – 162	74 – 390
16 – 18 років	47 - 119	52 - 171

Вміст лужної фосфатази в дитячому віці вище і значно варіює.

Дані величини орієнтовні, відповідно до правил GLP (Належної Лабораторної Практики) рекомендується визначення власних нормальних величин в кожній лабораторії, характерних для обстежуваного контингенту.

ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Фермент присутній практично у всіх тканинах організму, але особливо біля і усередині клітинних мембран, а також в плаценті, епітелії кишечника, ниркових каналцях, остеобластах і печінки. Джерелом сироваткової лужної фосфатази є печінка і кістки.

Підвищення вмісту сироваткової лужної фосфатази може бути викликане наступними причинами:

↑. При загоєнні переломів; первинний і вторинний гіперпаратироїдизм; остеомалаяція; ювенільний рахіт; метастази раку в кістці; остеогенна саркома; мієломна хвороба; лімфогранулематоз з поразкою кісток; хвороба Гоше з резорбцією кісток; хвороба Педжета; синдром Кушинга; уремічна остеодистрофія; поразка ниркових каналців, що поєднується з втратою фосфатів і/або кальцію і що приводять до рахіту з вторинним гіперпаратироїдизмом або без нього; «нирковий рахіт», обумовлений вітамін-D-резистентним рахітом, що поєднується з вторинним гіперпаратироїдизмом; інфекційний мононуклеоз; неускладнений позапечінковий холестаза; цитомегаловірусна інфекція у дітей; холангіт і

холангіоліт, гепатоцелюлярний некроз з жовтяницею або без неї; портальний цироз; абсцес печінки; первинна гепатоцелюлярна карцинома; вторинний рак; активна регенерація (проліферація гепатоцитів або жовчних проток); печінкові вузлики (метастази пухлини, кісти, паразити, амілоїд, туберкульоз, саркоїдоз, лейкемія); гепатити, викликані інфекцією, хімікаліями, ліками, серцевою недостатністю; хронічне вживання протисудомних засобів; позапечінковий сепсис; коліт язви; регіонарний ентерит; кишкові бактерійні інфекції; тиреотоксикоз; доброякісна перехідна гіперфосфатаземія; інфаркт легені і нирки; панкреатит, присутність ізоферментів Реган або Нагао; прийом фенітоїна і алкоголю; індукція ферменту.

↓. Гіпотіроїдизм; цинга; виражена анемія; квашиоркор; ахондроплазія; кретинізм; накопичення радіоактивних речовин в кістках; гіпофосфатаземія; природжена гіпофосфатаземія; дефіцит вітаміну В12 (пернеціозна анемія); недолік цинку і магнію в їжі.

Фізіологічні зміни, такі як зростання кістки або вагітність, також можуть викликати підвищення рівня лужної фосфатази.

Клінічний діагноз повинен встановлюватися на основі інтеграції клінічних і лабораторних даних.

ІНТЕРФЕРЕНЦІЯ

Проведенню аналізу перешкоджають: фториди, оксалати, цитрати, ЕДТО як антикоагулянт. Гемоліз перешкоджає проведенню аналізу, оскільки лужна фосфатаза присутня в еритроцитах ^{1,2}.

На хід визначення можуть впливати деякі ліки і речовини ^{3,4}.

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Для контролю ходу реакції і процедури вимірювання рекомендується використовувати контрольні сироватки із значеннями активності лужної фосфатази, визначеними даним методом. Наприклад: Diacon N, Diacon P (Австрія), TruLab N, TruLab P (Німеччина), «Біоконт С» (Росія), "ФілоНорм", "ФілоПат"(Україна).

Якщо значення контролю виходять за межі встановленого діапазону, перевірте обладнання, реактиви та можливі технічні проблеми.

Кожна лабораторія повинна встановити власну внутрішню систему контролю якості та коригуючі дії, якщо контроль не відповідає допустимим нормам.

ПРИМІТКИ

1. Якщо активність проби вище 1200 МОд/л, її розводять фізіологічним розчином (0,9% хлориду натрію). Результат перемножують на коефіцієнт розведення.
2. Температура реакції: Аналіз може бути виконаний при температурі 30/37 °С. Приведені нижче чинники перерахунку можуть бути використані для людської сироватки: 37/30°C = 1.245.
3. **Розраховано при витраті розчинів реагентів 4,0 мл (макро-), 2,0 мл (напівмікро-), 1,0 мл (мікро-).**

УТИЛІЗУВАННЯ

Всі зразки для аналізу вважають за матеріал, який може бути інфікований, і спільно з можливими залишками реактивів підлягає знищенню відповідно до затверджених внутрішньолікарняних правил.

Паперову упаковку здайте в макулатуру, виполоскану тару - в сортоване сміття.

ЛІТЕРАТУРА

1. McComb R.V., Bowers G.N. Clin.Chem. 1972, 18, 97.
2. Энциклопедия клинических лабораторных тестов (под ред. Н.У.Тица). «Лабинформ», Москва, 1997, стр. 525-526.
3. Burtis CA, Ashwood ER. Eds. Tietz textbook of clinical chemistry. 3rd ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1999. p. 1829.
4. Soldin JS, Hicks JM. Pediatric reference intervals. 6th ed. Washington: AACCC Press, 2007. p. 11.
5. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997).



ТОВ НВП «Філіцит-Діагностика»,

Україна, 49051 м. Дніпро, вул. Каштанова, 32

Тел./факс: (056) 747-47-76, 747-45-34

Тел.: (093) 573-75-35, (067) 535-15-73, (095) 168-36-54

E-mail: filicit@ukr.net <http://www.felicit.com.ua>