

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ «ПО КОНЕЧНОЙ ТОЧКЕ» С П-НИТРОФЕНИЛФОСФАТОМ (КАТ.№ В-12272)

Утверждена приказом Росздравнадзора от 24.05.2010 г. № 4611-Пр/10
РУ № ФСР 2010/07834 от 24.05.2010 г.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для фотометрического количественного определения активности щелочной фосфатазы (ЩФ) в сыворотке крови в клинико-диагностических лабораториях и в научно-исследовательской практике. Набор рассчитан на 125 определений при расходе рабочего реагента 1 мл на определение.

ПРИНЦИП МЕТОДА

ЩФ катализирует реакцию гидролиза *p*-нитрофенилфосфата натриевой соли (*p*-НФФNa₂) с образованием *p*-нитрофенола, окрашенного в щелочной среде в жёлтый цвет. Интенсивность окраски раствора пропорциональна активности ЩФ.

СОСТАВ НАБОРА

Реагент 1. АМП-буфер 100 мл
Реагент 2. Субстрат (*p*-НФФNa₂) 25 мл
Реагент 3. Ингибитор, концентрат 50 мл
Калибратор (*p*-нитрофенол), 0,02 ммоль/л 5 мл

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность – не более 25 Е/л.

Линейность – от 30 до 400 Е/л с отклонением не более 7%.

Коэффициент вариации – не более 7%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Во избежание возможного инфицирования при работе с образцами крови необходимо надевать одноразовые резиновые перчатки.

В состав набора входит щелочной раствор АМП-буфера. При попадании его на кожу и слизистые поражённое место следует промыть большим количеством проточной воды.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Спектрофотометр, фотоэлектроколориметр, анализаторы открытого типа различных изготовителей, дозаторы, позволяющие отбирать объёмы 0,02 мл, 0,5 мл, и 2,0 мл, термостат, секундомер, пробирки вместимостью 10-20 мл, штатив.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Свежая сыворотка крови, свободная от гемолиза.

ЩФ стабильна в сыворотке крови в плотно закрытой пробирке при 4-8°С в течение 7 суток, при -20°С – в течение 2 месяцев [1].

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

1. Приготовление рабочего реагента

Смешать необходимое количество АМП-буфера и субстрата в соотношении 4:1. Реагент стабилен при хранении в посуде из тёмного стекла при 2-8°С в течение 7 дней, при 18-25°С – в течение 8 часов.

2. Приготовление рабочего раствора ингибитора

Концентрат ингибитора развести дистиллированной водой до 500 мл. Реагент стабилен при хранении в посуде из полиэтилена при 18-25°С в течение всего срока годности набора.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Длина волны 405 (400-425) нм.

Кювета с длиной оптического пути 10 мм.

Температура проведения реакции 37°С.

Приготовить пробы в соответствии со схемой определения (объёмы компонентов могут быть пропорционально изменены).

Схема определения

Раствор	Опытная проба	Холодная проба
Рабочий реагент, мл	0,5	0,5
<i>Инкубировать при температуре 37°С в течение 5 минут.</i>		
Образец, мл	0,02	-
<i>Инкубировать точно 10 минут при температуре 37°С.</i>		
Ингибитор, рабочий раствор, мл	2,0	2,0
Образец, мл	-	0,02

Пробы тщательно перемешать и измерить оптическую плотность опытной пробы (Е) против холодной пробы.

Окраска стабильна не менее 1 часа.

РАСЧЁТ

Активность **А** ЩФ при 405 нм рассчитать по формуле:

$$A = 704 \cdot E$$

Если оптическая плотность измеряется при другой длине волны или на фотоэлектроколориметре со светофильтрами, а также если реакция проводится при другом соотношении реагентов, активность ЩФ следует рассчитывать по формуле:

$$A = \frac{E \cdot V_{\text{полн.}} \cdot 1000}{V_{\text{обр.}} \cdot \varepsilon \cdot t \cdot l}$$

где, **V_{полн.}** – полный объём реакционной смеси, мл;
ε – коэффициент молярной экстинкции *p*-нитрофенола, л/(ммоль · см), при 405 нм ε = 179;
1000 – коэффициент пересчёта в Е/л;
V_{обр.} – объём образца, мл;
t – время реакции опытной пробы, мин.;
l – длина оптического пути, см;
E – оптическая плотность опытной пробы.

Определение коэффициента молярной экстинкции ε

В кювету внести необходимое количество калибратора (*p*-нитрофенол) и измерить его оптическую плотность (**E_{кал.}**) против дистиллированной воды.

Рассчитать коэффициент молярной экстинкции по формуле:

$$\varepsilon = \frac{E_{\text{кал.}}}{l \cdot 0,02}$$

ПАРАМЕТРЫ ДЛЯ БИОХИМИЧЕСКИХ АНАЛИЗАТОРОВ

Тип анализатора	Любой
Метод измерения	Конечная точка
Длина волны, нм	405 (400-425)
Измерение против	Холостой пробы
Температура реакции	37°C
Единица измерения	Е/л
Число знаков после запятой	0
Фактор	704*
Соотношение реагент/проба	-
Время реакции, сек	-
Верхний предел абсорбции реагента против воды, E	1,0
Границы линейности	30-400
Максимум нормы, Е/л	120**
Минимум нормы, Е/л	36**

* Для каждого анализатора желательно уточнить фактор пересчёта по калибратору, входящему в состав набора (формула и процедура измерения коэффициента молярной экстинкции приведена выше) или по контрольным сывороточным калибраторам, аттестованным данным методом.

В случае возникновения каких-либо трудностей можно запросить адаптированную инструкцию по работе с набором «КлиниТест-ЩФ» на вашем анализаторе.

**При 37°C.

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Если активность ЩФ в исследуемом образце выше 400 Е/л образец развести физраствором в 10 раз, анализ повторить, величину рассчитанной активности умножить на 10.
2. Оксалаты, фториды, ЭДТА, ингибирующие ферменты, мешают определению.

НОРМАЛЬНЫЕ ВЕЛИЧИНЫ

При 37°C 36-120 Е/л

Рекомендуется в каждой лаборатории уточнять диапазон нормальных величин.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор должен храниться при температуре 2-8°C в упаковке предприятия-изготовителя в течение всего срока годности (12 месяцев). Допускается однократное замораживание. Реагенты после вскрытия флаконов можно хранить при 2-8°C в течение всего срока годности набора. Калибратор после вскрытия флакона допускается хранить при 2-8°C не более 7 дней.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Контроль качества может быть проведён по контрольным сывороткам, аттестованным данным методом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Обеспечение качества лабораторных исследований. Преаналитический этап. Под ред. В.В. Меньшикова, М., 1999, «Лабинформ», с. 174-175.