



In vitro solutions

Набор биохимических реагентов для ветеринарии

ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА ДиаВетТест



ООО «ДИАВЕТ»

142290, г. Пущино, Московской обл.

<https://diakonvet.ru/>

info@diakonvet.ru

НАЗНАЧЕНИЕ

ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА ДиаВетТест – это набор жидких, готовых к употреблению реагентов для определения активности щелочной фосфатазы кинетическим методом в сыворотке и плазме крови животных и птиц.

Набор реагентов должен использоваться квалифицированным персоналом в области ветеринарной лабораторной диагностики.

Количество определений зависит от объема фасовки реагентов и типа используемого биохимического анализатора.

МЕТОД

Кинетический фотометрический тест в соответствии с рекомендациями DGKC (Германское Общество Клинической Химии).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Щелочная фосфатаза катализирует реакцию гидролиза п-нитрофенилфосфата с образованием эквимольного количества п-нитрофенола и фосфата. Скорость образования п-нитрофенола прямо пропорциональна активности щелочной фосфатазы и измеряется фотометрически при длине волны 405 нм.

СОСТАВ НАБОРА

Реагент 1	Буферный раствор, pH 9,95, содержащий Диэтанолламин $\geq 1,0$ моль/л
Реагент 2	Буферно-субстратный раствор, pH 9,0, содержащий п-нитрофенилфосфат $>20,0$ ммоль/л Азид натрия 0,095%

Реагенты и калибраторы ДиаВетТест поставляются жидкими и готовыми к использованию.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Параметр	Значение
Линейность	40–1200 Е/л
Отклонение от линейности	не более 5%
Чувствительность	не более 30 Е/л
Коэффициент вариации	не более 5%

Примечание. Нормальные показатели для разных животных могут варьировать в широких пределах. При активности щелочной фосфатазы в образце более 1200 Е/л (изменение оптической плотности пробы в минуту $\Delta A/\text{мин}$ не должно превышать 0,3) анализируемую пробу следует развести физиологическим раствором (0,9% NaCl) в 5 раз, повторить анализ и полученный результат умножить на 5.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для внутреннего контроля качества с каждой серией образцов рекомендуем проводить измерения контрольной сыворотки «Норма» (TruLab N) (метод DGKC), контрольной сыворотки «Патология» (TruLab P) (метод DGKC) производства «DiaSys Diagnostic Systems GmbH» (Германия).

Возможно использование других контрольных сывороток, аттестованных данным методом и не уступающих по своим свойствам рекомендуемому.

Для калибровки автоматических фотометрических систем и уточнения фактора пересчета для полуавтоматических биохимических анализаторов рекомендуем использовать мультикалибратор TruCal U (метод DGKC) производства «DiaSys Diagnostic Systems GmbH» (Германия). Концентрация ЩФ в TruCal U прослеживается до коэффициента молярной экстинкции в соответствии с оригинальной процедурой DGKC.

Калибровку рекомендуем проводить в следующих случаях: при непрохождении контроля качества (в случае выхода значений контроля качества за пределы установленных диапазонов для

используемого лота контрольного материала), при использовании нового набора.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Только для диагностики *in vitro*.

2. Реагент 1 содержит диэтанолламин. Существует опасность поражения глаз. В случае попадания в глаза – немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь за медицинской помощью. Используйте защитную одежду, перчатки и очки!

В реагенте 2 содержится токсичный компонент – азид натрия. При работе с ним соблюдайте осторожность и не допускайте попадания на кожу и слизистые; при попадании немедленно промойте пораженное место большим количеством проточной воды. При проглатывании выпейте 0,5 л теплой воды и вызовите рвоту. При необходимости обратитесь к врачу.

В ходе реакции образуется п-нитрофенол, который ядовит при вдыхании, проглатывании или поглощении через кожу. В случае контакта реакционной смеси с кожей или слизистыми оболочками – обильно промойте водой.

3. Предпринимать обычные при работе с лабораторными реагентами меры предосторожности.

4. Не использовать реагенты, калибраторы и контроли после истечения срока годности.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Биреагентная схема – запуск реакции субстратом.

Реагенты 1 и 2 готовы к использованию.

Монореагентная схема – запуск реакции образцом.

Для приготовления рабочего реагента: смешать 4 объема Реагента 1 и один объем Реагента 2. Для стабилизации компонентов раствора рабочий реагент перед использованием следует выдерживать 20–30 мин при комнатной температуре (15–25°C). Рабочий реагент можно хранить при температуре 2–8°C в течение 4 недель или при комнатной температуре (15–25°C) в течение 5 суток при условии достаточной герметичности флаконов и отсутствия загрязнения, в защищенном от света месте.

Следует тщательно закрывать флаконы с Реагентами 1 и 2 непосредственно после каждого использования, в том числе при хранении на борту автоматических биохимических анализаторов (в нерабочее время).

Лиофилизированный мультикалибратор TruCal U производства «DiaSys Diagnostic Systems GmbH» (Германия) готовят согласно прилагаемой к каждому лоту инструкции.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Адаптации к автоматизированным системам запрашивайте дополнительно.

Перед проведением анализа рабочий реагент/монореагент следует прогреть при температуре $37 \pm 1,0^\circ\text{C}$ в течение 5 мин.

Компоненты реакционной смеси отбирать в количествах, указанных в таблицах.

Биреагентная схема – запуск реакции субстратом

Отмерить, мкл	Контрольная (холостая) проба	Калибровочная проба	Опытная проба
Дистиллированная вода	20	–	–
Мультикалибратор	–	20	–
Образец	–	–	20
Реагент 1	1000	1000	1000
Перемешать, инкубировать 1 мин, затем добавить:			
Реагент 2	250	250	250

Перемешать. Через 1 мин измерить оптическую плотность (A_1) и включить секундомер. Измерить оптическую плотность (A_2) через 1, 2 и 3 мин при длине волны 405 нм, при 37°C , относительно холостой пробы, в кюветах с длиной оптического пути 1 см.



Монореагентная схема – запуск реакции образцом

Отмерить, мкл	Контрольная (холостая проба)	Калибровочная проба	Опытная проба
Дистиллированная вода	20	–	–
Мультикалибратор	–	20	–
Образец	–	–	20
Рабочий реагент	1000	1000	1000

Пробу и рабочий реагент перемешать. Через 1 мин измерить оптическую плотность (A₁) и включить секундомер. Измерить оптическую плотность (A₂) через 1, 2 и 3 мин при длине волны 405 нм, при 37°C, относительно холостой пробы, в кюветках с длиной оптического пути 1 см.

Вычислить среднее значение ΔА/мин образца/мультикалибратора

Примечание: Количество реагентов и анализируемых образцов может быть пропорционально изменено в зависимости от объема используемой кюветы и типа используемого биохимического анализатора (соотношение образца к рабочему реагенту составляет 1:50).

РАСЧЕТЫ

По мультикалибратору

$$\text{Активность ЩФ [Е/л]} = \frac{\Delta A / \text{мин}_{\text{оп}}}{\Delta A / \text{мин}_{\text{кал}}} \times$$

× Активность ЩФ в мультикалибраторе [Е/л]

где: ΔА/мин_{оп} – изменение оптической плотности опытной пробы в минуту, ед.опт.пл.;

ΔА/мин_{кал} – изменение оптической плотности калибровочной пробы в минуту, ед.опт.пл.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ/ПОМЕХОУСТОЙЧИВОСТЬ

Аскорбиновая кислота до 300 мкг/мл, билирубин до 684 мкмоль/л, гемоглобин до 1,5 г/л и липемия до 22,52 ммоль/л триглицеридов не влияют на точность анализа. Дополнительных веществ (АЛФ), устраняющих липемичность сыворотки, не требуется.

ТРАНСПОРТИРОВКА, УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор должен храниться при температуре 2-8°C в упаковке предприятия-изготовителя в течение всего срока годности. Допускается хранение наборов при температуре до 25°C не более 5 суток.

Замораживание компонентов набора не допускается.

Транспортирование должно производиться с использованием крытого грузового авто, авиа, ж/д транспорта, в соответствии с требованиями и правилами, принятыми на данном виде транспорта, при температуре 2-8°C. Допускается транспортирование наборов при температуре до 25°C не более 5 суток.

Изделия, транспортированные и хранившиеся с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

Срок годности набора – 18 месяцев.

Прекратить применение серии изделия по истечению срока ее годности.

При соблюдении условий хранения все компоненты набора стабильны в течение всего срока годности.

Реагенты 1 и 2 после вскрытия флаконов могут храниться при температуре 2-8°C в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора при условии достаточной герметичности флаконов и отсутствии загрязнения.

Рабочий реагент можно хранить в темном месте при температуре 2-8°C в течение 4 недель и при комнатной температуре (15-25°C) в течение 5 суток, при условии достаточной герметичности флаконов и отсутствии загрязнения.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

ТРЕБОВАНИЯ ОХРАНЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Набор ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА ДиаВетТест не содержит взрывоопасных веществ, представляющих угрозу окружающей среде и здоровью медицинского персонала, при соблюдении всех мер безопасности и утилизации набора, рекомендованных производителем.

УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ

Утилизацию после проведения исследования следует проводить в соответствии с местными правилами, принятыми для лабораторных отходов.

ИЗГОТОВИТЕЛЬ

АО «ДИАКОН-ДС», 142290, Московская область, г. Пущино, ул. Грузовая, д.1а.

Система менеджмента качества сертифицирована на соответствие требованиям: EN ISO 13485, ГОСТ ISO 13485



ПАМЯТКА ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ

Щелочная фосфатаза - фермент, катализирующий отщепление остатка фосфорной кислоты от различных органических соединений, - наиболее активна в щелочной среде. Очень распространена во всех тканях, главным образом в печени, в желчных канальцах, канальцах почек, тонком кишечнике, костях и плаценте. Общая активность щелочной фосфатазы в циркулирующей крови здоровых животных складывается из активности печеночных и костных изоферментов, которая наиболее велика у растущих животных.

Набор реагентов (ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА ДиаВетТест) возможно использовать на различных моделях полуавтоматических и автоматических и биохимических анализаторах открытого типа.

Не допускается использование набора по истечению срока годности, указанной на упаковке!

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Щелочная фосфатаза в основном содержится внутри клеток печени и костей. В циркулирующую кровь она попадает при разрушении этих клеток. Таким образом повышение активности фермента в крови чаще всего происходит при патологиях печени, желчных протоков, костных опухолях и т.п. Доброкачественное повышение щелочной фосфатазы бывает при беременности. Снижение активности фермента может быть связано с нарушением роста костей, гипотиреозом.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

Кат. №	Состав набора, мл	Общий объем, мл
DV 794 001	Реагент 1: 2х68 Реагент 2: 2х17	170
DV 794 002	Реагент 1: 6х68 Реагент 2: 6х17	510

Забор образцов

1. Требования к квалификации персонала.

К выполнению исследований допускаются лица, прошедшие подготовку (лаборанты, ветеринарные фельдшера, ветеринарные врачи, химики и др.) по эксплуатации анализатора и методикам выполнения измерений.

2. Отбор проб.

2.1. Отбор крови проводят утром, до кормления животных и проведения лечебных мероприятий. «Правила взятия патологического материала, крови, кормов и пересылки их для лабораторного исследования» утв. Минсельхоз СССР 24.06.1971.

2.2. Для отбора проб крови применяют стеклянные пробирки многоразового использования или системы взятия крови (СВК) по ГОСТ ISO 6710-2011.

2.2.1. Правила взятия крови при использовании вакуумных систем:

Обязательное соответствие цвета вакуумной системы и целей исследования.

Для биохимических исследований используются СВК с красной, желтой или оранжевой крышкой.

Каждая пробирка содержит определенное количество реагента для указанного на ней объема крови. Пробирки заполняются в соответствии с указанным уровнем, в пределах $\pm 10\%$ от указанного объема.

При применении СВК с красной/желтой/оранжевой маркировкой, которые содержат активаторы свертывания с биологически инертным гелем, образующие после центрифугирования барьер, отделяющий сыворотку от форменных элементов крови, что позволяет получать образцы более высокого качества и сократить время коагуляции (указывается производителем в инструкциях по применению СВК).

Внимание! Неправильное соотношение крови и реагента в пробе ведет к недостоверным результатам анализа.

Сразу после заполнения пробирку необходимо аккуратно перевернуть 4–10 раз на 180° для смешивания крови с наполнителем. Количество перемешиваний указывается в инструкции по применению. Перемешивание необходимо проводить аккуратно, пробирку не трясти, во избежание коагуляции и гемолиза.

Внимание! В плохо перемешанной пробе образуются микросгустки, приводящие к искажению результатов анализов, а также к поломкам лабораторных анализаторов.

3. Транспортировка.

Пробирки с кровью плотно закрываются пробками и в строго вертикальном положении в термоконтейнерах с хладагентом перемещаются в лабораторию. Время доставки не должно превышать 24 часа при температуре 2,0–8,0°C.

Следует избегать тряски во избежание развития гемолиза. Температура ниже 4°C и выше 30°C может существенно изменить содержание в образце многих аналитов.

4. Подготовка проб:

4.1. Получение плазмы крови.

Рекомендуем использовать вакуумные пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта. Отобранные пробы крови переливают в центрифужные пробирки и центрифугируют 20–30 минут при 2000–3000 об/мин., отделившуюся плазму переносят в чистые сухие пробирки.

При применении СВК допускается центрифугирование непосредственно в первичной пробирке, в соответствии с инструкцией к использованию.

4.2. Получение сыворотки крови.

Сыворотка крови должна быть отделена от форменных элементов не позднее 1 часа после забора материала.

Кровь в стеклянных пробирках, в течение часа после забора, ободят тонкой спицей из нержавеющей стали диаметром 1,0–1,5 мм и ставят в термостат при температуре 37–38°C на 30 минут для окончательного отделения сыворотки. Отделившуюся сыворотку переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют в течение 20–30 минут при 2000–3000 об/мин.

Внимание! Исследования не проводятся при:

- гемолизе, хилезе сыворотки (плазмы) крови (за исключением исследований, на которые наличие гемолиза, хилеза не влияет [6]).
- поступлении в СВК с несоответствующей маркировкой (то есть материал взят не с тем антикоагулянтом, консервантом и др.).
- наличии сгустков в пробах с антикоагулянтом.
- поступлении в СВК с истекшим сроком годности.

5. Хранение.

Щелочная фосфатаза сыворотки крови стабильна, поэтому сыворотка может храниться при комнатной температуре (15–25°C) не более 4 суток. Сыворотку допускается хранить и в холодильнике при 2–8°C не более 48 ч, однако при этом активность фермента может повышаться на 10%. Хранение сыворотки 1 месяц при –20°C допускается, но не рекомендуется, так как в размороженной сыворотке активность фермента падает на $\geq 10\%$.

Загрязненные образцы хранению не подлежат!

Замораживать образцы можно не более одного раза!

6. Возможные причины получения недостоверных результатов:

- низкое качество дистиллированной (деионизированной) воды. Для повышения точности калибровки рекомендуется использовать высокоочищенную воду, как для приготовления контрольных сывороток, так и для самой калибровки (нулевая точка).

- недостаточно чистая посуда. Посуду следует мыть хромовой смесью или раствором 4М соляной кислоты в дистиллированной (деионизированной) воде, затем тщательно ополоснуть дистиллированной (деионизированной) водой.

- загрязнение блоков кювет. Рекомендуется регулярно проверять чистоту измерительных кювет с использованием соответствующих утилит анализатора и при необходимости проводить очистку согласно инструкции по эксплуатации на прибор.

- несоблюдение условий хранения и эксплуатации наборов, калибраторов и стандартных сывороток. Рекомендуется заменить реагенты, калибраторы, стандартные сыворотки.

- технические ошибки при программировании методов на автоматических анализаторах. Необходимо проверить соответствие параметров установленной методики с адаптациями производителя к конкретному анализатору.

- ошибки при проведении преаналитического этапа. Необходимо повторно произвести забор крови и выделение сыворотки (плазмы) с соблюдением установленных норм и правил.

- ошибки при приготовлении реагентной смеси, и нарушении соотношения реагент/образец (при работе на полуавтомате).

ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА ДиаВетТест



тических биохимических анализаторах). *Необходимо повторить смешивание.*

- недостоверные результаты при проведении контроля качества. *Необходимо провести калибровку прибора в соответствии с инструкцией по эксплуатации анализатора.*

НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ*

Образец	Нормальный диапазон, Ед/л
Собаки	48,0-75,0
Кошки	49,0-90,0
Лошади	70,0-250
Крупный рогатый скот (КРС)	50,0-200
Свиньи	140-200
Овцы	68,0-387
Куры	34,0-2600

*Рекомендуем в каждой лаборатории уточнять диапазон значений нормальных величин для обследуемых животных, которые могут зависеть от различных факторов

Возможные причины изменения уровня щелочной фосфатазы:

Повышение уровня щелочной фосфатазы:

- Внутри- и внепеченочный холестаз;
- Заболевания печени (цирроз, некроз, опухоли печени, инфекционный или токсический гепатит);
- Повышение активности остеобластов или распад костной ткани: рост костей у молодых животных, опухоли костей, остеомалация, заживление переломов;
- Увеличение концентрации глюкокортикоидов в крови у собак, синдром Кушинга;
- Гиперпаратиреоз;
- Гипертиреоз;
- Беременность.

Понижение уровня щелочной фосфатазы:

- Гипотиреоз;
- Нарушения роста кости (ахондроплазия, кретинизм, дефицит аскорбиновой кислоты).

ВНИМАНИЕ! Лабораторное исследование только этого параметра не является достаточным основанием для постановки диагноза, но может быть частью комплексного клиникотерапевтического обследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Boyd J.W. The interpretation of serum biochemistry test results in domestic animals, in Veterinary Clinical Pathology, Veterinary Practice Publishing Co., Vol. XIII, # II, 1984.
2. Кондрахин И.П. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики. – М.: 2004.
3. Медведева М. А. Клиническая ветеринарная лабораторная диагностика. – М.: «Аквариум Принт», 2013–416 с.
4. Холод В.М. Справочник по ветеринарной биохимии. – В.: 2005.
5. Guder W.G., Zawta B. et al. The Quality of Diagnostic Samples. 1st ed. Darmstadt: GIT Verlag; 2001.
6. Д. Мейер, Дж. Харви. Ветеринарная лабораторная медицина. Интерпретация и диагностика. Пер. с англ. – М.: Софион. 2007, 456 с.
7. Методические рекомендации по применению наборов реагентов «ДиаВетТест» для биохимических исследований сыворотки (плазмы) крови животных на автоматических и полуавтоматических анализаторах. – М.: ФГБУ ЦНМВЛ, Россельхознадзор, 2018.
8. I.S.I.S., Standard International Units - March 2002.

За дополнительной информацией или при рекламациях следует обращаться в ООО «ДИАВЕТ»:

142290, г. Пущино, Московской обл.

<https://diakonvet.ru/>

info@diakonvet.ru

Рекомендовано Центральной научно-методической ветеринарной лабораторией

