

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 200_ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусайнов

_____ 200_ г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения активности
креатинкиназы в сыворотке крови кинетическим УФ-методом
(КРЕАТИНКИНАЗА-НОВО)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов КРЕАТИНКИНАЗА-НОВО предназначен для количественного определения общей активности креатинкиназы в сыворотке крови человека кинетическим УФ-методом в клинико-диагностических и биохимических лабораториях и научно-исследовательской практике.

1.2. Набор рассчитан, в зависимости от варианта комплектации, на проведение 50 (вариант 1) или 100 (вариант 2) определений при расходе 1,0 мл рабочего раствора реагентов на одно определение.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Креатинкиназа катализирует в присутствии АДФ и креатинфосфата синтез АТФ, который с участием гексокиназы фосфорилирует глюкозу с образованием глюкозо-6-фосфата. В присутствии глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы происходит реакция окисления глюкозо-6-фосфата и сопряженная с ней реакция восстановления НАДФ в НАДФН. Скорость восстановления НАДФ прямо пропорциональна активности креатинкиназы и измеряется фотометрически при длине волны 340 нм.

2.2. Состав набора

Набор может поставляться в двух вариантах комплектации.

В состав набора входят:

– реагент 1: буферный раствор, рН $6,7 \pm 0,2$, содержащий имидазол, 0,09 моль/л; α -D-

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: нач. отдела, к.б.н. Л.В. Гаевой и вед. научным сотрудником Т.И. Суменко.

глюкозу, 0,02 моль/л; магния ацетат, 0,20 моль/л; этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевую соль, 2,0 ммоль/л; натрия азид, 0,1% – 5 флаконов (по 10 мл) или 5 флаконов (по 20 мл);

– реагент 2: имидазол, 20,0 ммоль; креатинфосфат, 6,0 ммоль; β -никотинамидадениндинуклеотид фосфат (β -НАДФ), 0,4 ммоль; гексокиназа, 600 Е; глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, 400 Е; N-ацетилцистеин, 4,0 ммоль; аденозиндифосфат, 0,4 ммоль; аденозинмонофосфат, 1,0 ммоль; диаденозинпентафосфат, 2,0 мкмоль – 5 флаконов (лиофилизированная смесь) (варианты 1 и 2).

Конечные концентрации в рабочем растворе реагентов:

- имидазольный буфер, pH 6,8 – 0,1 моль/л;
- креатинфосфат – 30,0 ммоль/л;
- β - НАДФ – 2,0 ммоль/л;
- АДФ – 2,0 ммоль/л;
- АМФ – 5,0 ммоль/л;
- гексокиназа – 3000 Е/л;
- глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа – 2000 Е/л;
- N-ацетилцистеин – 20,0 ммоль/л;
- диаденозинпентафосфат – 0,01 ммоль/л.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Линейность. Линейная область определения активности креатинкиназы – в диапазоне от 50 до 1000 Е/л. Отклонение от «линейности» - не более 5%.

3.2. Чувствительность определения – не более 40 Е/л.

3.3. Коэффициент вариации результатов определений – не более 5%.

3.4. Нормальные величины активности креатинкиназы (при температуре +37 °С):

– женщины от 50 до 165 Е/л;

– мужчины от 50 до 190 Е/л.

3.5. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить диапазон нормальных величин активности креатинкиназы у обследуемого контингента людей.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

4.2. Реагент 1 содержит токсическое соединение – натрия азид. При работе с этим реагентом и рабочим раствором реагентов следует избегать попадания растворов на кожу и слизистые; при попадании немедленно промыть пораженное место большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с набором необходимо соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- Спектрофотометр или биохимический анализатор (длина волны 340 нм, термостабируемая кювета с длиной оптического пути 10 мм);
- пипетки, позволяющие отбирать объёмы жидкости 40 и 1000 мкл;
- пробирки стеклянные вместимостью 5-10 мл;
- термостат, поддерживающий температуру $+37 \pm 0,5$ °C;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- секундомер;
- вода дистиллированная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Негемолизированная сыворотка крови. Сыворотку крови следует отделить от форменных элементов крови не позднее, чем через 1 ч после взятия крови.

Образцы сыворотки крови можно хранить при комнатной температуре ($+18-25$ °C) не более 4-8 ч, при температуре $+2-8$ °C – не более 2 сут или при температуре минус 20 °C и ниже – не более 1 мес. Повторное размораживание образцов сыворотки крови не допускается.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Приготовление рабочего раствора реагентов

Содержимое одного флакона с реагентом 2 растворить в содержимом одного флакона с реагентом 1 при перемешивании вручную, закрыв флакон той же пробкой. Рабочий раствор реагентов после полного растворения лиофилизата выдержать при комнатной температуре в течение времени не менее 30 мин.

Приготовленный рабочий раствор реагентов можно хранить в плотно закрытом виде при температуре $+2-8$ °C не более 3 нед или при комнатной температуре не более 3 сут.

7.2. Перед началом работы кювету фотометра или биохимического анализатора и ра-

бочий раствор реагентов нагреть до температуры +37 °С. При измерении оптической плотности постоянно поддерживать температуру +37 °С.

7.3. Внести в кювету 1000 мкл подогретого до температуры +37 °С рабочего раствора реагентов, добавить 40 мкл анализируемой сыворотки крови, тщательно перемешать и включить секундомер.

Примечание. В зависимости от объема используемой кюветы количество рабочего раствора реагентов и анализируемой сыворотки крови может быть пропорционально изменено (соотношение сыворотки крови к рабочему раствору реагентов составляет 1:25).

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Через 2 мин измерить оптическую плотность при длине волны 340 нм против воздуха. Повторить измерения 3 раза с интервалом времени 1 мин (точно!).

8.2. При использовании автоматических биохимических анализаторов анализ проводится согласно инструкции по применению.

9. РАСЧЁТЫ

Рассчитать изменение оптической плотности анализируемой пробы в 1 мин (ΔE /мин) по формуле:

$$\Delta E / \text{мин} = \Delta E_n / t,$$

где: ΔE_n – изменение оптической плотности пробы, ед. опт. плотн.;

t – интервал времени между измерениями, мин.

Активность креатинкиназы в анализируемом образце сыворотке крови определить по формуле:

$$A = (\Delta E / \text{мин}) \times F,$$

где: A – активность креатинкиназы, Е/л;

F – фактор пересчета для выражения активности креатинкиназы в Е/л ($F=4127$).

Примечание. 1 Е/л = 16,67 нмоль / (л×с).

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор реагентов КРЕАТИНКИНАЗА-НОВО должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности (1 год). Допускается хранение набора при температуре до +25 °С не более 10 сут. Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Рабочий раствор реагентов можно хранить в плотно закрытом виде при температуре +2-8 °С не более 3 нед или при комнатной температуре (+18-25 °С) не более 3 сут.

10.3. Для проведения анализа использовать негемолизированную сыворотку крови.

10.4. Образцы сыворотки крови можно хранить при комнатной температуре не более 4-8 ч, при температуре +2-8 °С – не более 2 сут или при температуре минус 20 °С и ниже – не более 1 мес.

Повторное размораживание образцов сыворотки крови не допускается.

10.5. Качество набора может проверяться по отечественным и зарубежным контрольным сывороткам, аттестованным данным методом.

10.6. В том случае, когда величина активности креатинкиназы в анализируемых образцах сыворотки крови превышает 1000 Е/л, образец следует развести физиологическим раствором в 10 раз (20 мкл исследуемого образца + 180 мкл физиологического раствора), повторить анализ и полученный результат умножить на 10.

10.7. Для отбора и добавления анализируемых проб и компонентов набора рекомендуется использовать полуавтоматические пипетки со сменными наконечниками, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования.

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

По вопросам, касающимся качества набора КРЕАТИНКИНАЗА-НОВО, следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 227-67-64, 227-75-50, тел./факс (383) 336-73-46

и в Институт стандартизации и контроля лекарственных средств ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора по адресу:

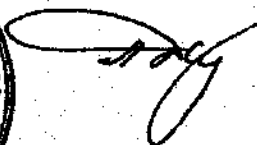
117246, Москва, Научный проезд, д. 14А, тел. (495) 120-60-95; 120-60-96.

Вед. научный сотрудник отдела биохимии



Т.И. Суменко

Генеральный директор
ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусанов