

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора

от _____ 20__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор



М.Д. Хусаинов
02 2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для определения активности панкреатической α -амилазы
в сыворотке, плазме крови и моче (субстрат CNP-олигосахарид)
(АМИЛАЗА ПАНКРЕАТИЧЕСКАЯ-НОВО-1)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов АМИЛАЗА ПАНКРЕАТИЧЕСКАЯ-НОВО-1 предназначен для количественного определения активности панкреатической α -амилазы кинетическим методом с иммуноингибированием в сыворотке, плазме крови и моче человека в клинико-диагностических и биохимических лабораториях и научно-исследовательской практике.

1.2. Набор рассчитан, в зависимости от варианта комплектации, на проведение 50 (вариант 1), 100 (вариант 2) или 200 (вариант 3) определений при расходе 0,8 мл реагента 1 и 0,2 мл реагента 2 на одно определение.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Метод определения основан на том, что активность слюнной α -амилазы ингибируется с помощью антител, панкреатическая α -амилаза гидролизует CNP-олигосахарид с образованием CNP (2-хлор-4-нитрофенол). Скорость образования CNP пропорциональна активности панкреатической α -амилазы и определяется фотометрически при длине волны 405 нм.

2.2. Состав набора

Набор может поставляться в трех вариантах комплектации (вариант 1, 2 и 3).

В состав набора входит:

– реагент 1: буферный раствор, pH $6,0 \pm 0,2$, содержащий MES, 50 ммоль/л; кальция хлорид, 6,25 ммоль/л; калия тиоцианат, 250 ммоль/л; натрия азид, 13,8 ммоль/л; монокло-

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: нач. отдела биохимии, к.б.н. Л.В. Гаевой и с.н.с. научно-производственной лаборатории отд. биохимии К.А. Черемисиной.

нальные антитела к слюнной α -амилазе, 25 мг/л; готовый к использованию – 4 флакона (по 10 мл) (вариант 1); 4 флакона (по 20 мл) (вариант 2) или 4 флакона (по 40 мл) (вариант 3);

– реагент 2: буферный раствор, pH $6,0 \pm 0,2$, содержащий MES, 50 ммоль/л; натрия азид, 13,8 ммоль/л; CNP-олигосахарид, 11,35 ммоль/л; готовый к использованию – 2 флакона (по 5,0 мл) (вариант 1), 4 флакона (по 5,0 мл) (вариант 2) или 4 флакона (по 10 мл) (вариант 3).

Конечные концентрации компонентов в реакционной смеси:

- буфер MES – 50 ммоль/л;
- кальция хлорид – 5 ммоль/л;
- калия тиоцианат – 250 ммоль/л;
- натрия азид – 13,8 Е/мл;
- моноклональные антитела к слюнной α -амилазе – 20 мг/л;
- CNP-олигосахарид – 2,27 ммоль/л.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Линейность. Линейная область определения активности панкреатической α -амилазы – в диапазоне от 20 до 1400 Е/л. Отклонение от «линейности» – не более 5%.

3.2. Чувствительность определения – не более 15 Е/л.

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

3.4. Нормальные величины активности α -амилазы:

- в сыворотке крови – от 20 до 53 Е/л;
- в моче – от 20 до 350 Е/л.

3.5. Рекомендуются в каждой лаборатории при использовании набора уточнить диапазон нормальных величин активности панкреатической α -амилазы у обследуемого контингента людей.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1.

4.2. Реагенты содержат токсичное соединение – натрия азид. При работе с реагентами следует избегать разбрызгивания и попадания компонентов набора на кожу и слизистые. В случае попадания реагентов на кожу и слизистые необходимо промыть поражённые участки большим количеством проточной воды.

4.3. Слюна и пот человека содержат большое количество α -амилазы и попадание ее в реакционную смесь завязит результаты анализа и уменьшит стабильность реагента. Необходимо исключить попадание экзогенной α -амилазы в реагент (работать в масках, для отбора реагента использовать полуавтоматические пипетки с одноразовыми наконечниками, флакон

после отбора реагента тут же закрывать и т.д.).

4.4. 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.).

4.5. 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:

- Полуавтоматический или автоматический биохимический анализатор, длина волны 405 нм, термостатируемая кювета с длиной оптического пути 10 мм;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 25, 250 и 1000 мкл;
- пробирки стеклянные вместимостью 5,0-10 мл;
- термостат, поддерживающий температуру $+37 \pm 0,5$ °C;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- секундомер;
- вода дистиллированная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Сыворотка, плазма крови без следов гемолиза, моча человека.

Образцы сыворотки, плазмы крови можно хранить при комнатной температуре ($+18-25$ °C) не более 7 сут, при температуре $+2-8$ °C не более 1 мес или при температуре минус 20 °C и ниже не более 3 мес. Повторное размораживание образцов сыворотки, плазмы крови не допускается.

Образцы мочи можно хранить при температуре $+2-8$ °C не более 10 сут, при комнатной температуре не более 2 сут или при температуре минус 20 °C и ниже не более 3 недель. Повторное размораживание образцов мочи не допускается.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка реагента 1 и реагента 2 к работе.

Реагент 1 и реагент 2 готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

Реагенты после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытом виде в темном

месте при температуре +2-8 °С не более 1 мес, при комнатной температуре (+18-25 °С) не более 2 недель.

7.2. Перед началом работы реагент 1 и реагент 2 нагреть до температуры +37 °С.

7.3. Внести в термостатируемую кювету биохимического анализатора, поддерживающую температуру +37±0,2 °С, 800 мкл подогретого реагента 1, добавить 20 мкл анализируемого образца, тщательно перемешать, выдержать 5 мин. Добавить 200 мкл подогретого до температуры +37 °С реагента 2, тщательно перемешать и включить секундомер.

Примечание. В зависимости от объема кюветы используемого анализатора количество реагентов и анализируемого образца может быть пропорционально изменено (соотношение образца (сыворотки, плазмы крови и мочи) к реагенту 1 и реагенту 2 составляет 1:40:10).

7.4. При использовании автоматических биохимических анализаторов кинетические измерения оптической плотности проводятся согласно инструкции по применению.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Через 1 мин после добавления реагента 2 измерить оптическую плотность реакционной смеси при длине волны 405 нм против воды. Повторить измерения 3 раза с интервалом времени 1 мин (точно!). При измерении оптической плотности постоянно поддерживать температуру +37±0,2 °С.

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 панкреатической α -амилазы (А), Е/л, в анализируемом образце определить по формуле:

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

где: $\overline{\Delta E} / \text{мин}$ – среднее арифметическое значение изменения оптической плотности анализируемой пробы за 1 мин, ед. опт. плотн./мин;

F – фактор пересчета.

Фактор пересчета (F) определяется по формуле:

$$F = (V \times 1000) / (\varepsilon \times v \times l) = (1,02 \times 1000) / (18,5 \times 0,02 \times 1) = 2757,$$

где: V – конечный объем реакционной смеси в кювете, мл;

v – объем анализируемой пробы, мл;

ε – коэффициент молярной экстинкции CNP (хлорпаранитрофенола) в условиях определения ($18,5 \text{ л} \times \text{моль}^{-1} \times \text{см}^{-1}$);

ℓ – длина оптического пути, см;

1000 – коэффициент пересчета для выражения активности α -амилазы в Е/л.

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

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор реагентов АМИЛАЗА ПАНКРЕАТИЧЕСКАЯ-НОВО-1 должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности (1,5 года). Допускается хранение набора при температуре до +25 °С не более 14 сут. Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Реагенты после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытом виде в темном месте при температуре +2-8 °С не более 1 мес, при комнатной температуре (+18-25 °С) не более 2 недель.

10.3. Для проведения анализа использовать сыворотку, плазму крови без следов гемолиза, мочу.

10.4. Образцы сыворотки, плазмы крови можно хранить при комнатной температуре не более 7 сут, при температуре +2-8 °С не более 1 мес или при температуре минус 20 °С и ниже не более 3 мес. Повторное размораживание образцов сыворотки, плазмы крови не допускается.

10.5. Образцы мочи можно хранить при комнатной температуре не более 2 сут, при температуре +2-8 °С не более 10 сут или при температуре минус 20 °С и ниже не более 3 недель. Повторное размораживание образцов мочи не допускается.

10.6. Качество набора может проверяться по отечественным и зарубежным контрольным сывороткам, аттестованным данным методом или методом IFCC liquid субстрат EPS (норма в сыворотке < 60 Е/л, в моче ~ 350 Е/л).

10.7. В том случае, если среднее изменение оптической плотности в мин (ΔE /мин) превышает 0,51, образец следует развести физиологическим раствором в 5 раз (50 мкл исследуемого образца + 200 мкл физиологического раствора), повторить анализ и полученный результат умножить на 5.

10.8. 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.

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

По вопросам, касающимся качества набора АМИЛАЗА ПАНКРЕАТИЧЕСКАЯ-НОВО-1, 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

С.н.с. научно-производственной
лаборатории отдела биохимии

К.А. Черемисина

Начальник отдела биохимии
ЗАО «Вектор-Бест», к.б.н.

Л.В. Гасвая

Проректор ГОУ ВПО НГМУ Росздрава
по лечебной работе, д.м.н., профессор
М.П.



Е.Л. Потеряева

Пробшнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
6 листов

Голуб