

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ АЛЬФА-АМИЛАЗЫ В СЫВОРОТКЕ, ПЛАЗМЕ КРОВИ И МОЧЕ (КАТ.№№ В-10261, В-10262, В-10263, В-10264, В-10265)

Утверждена приказом Росздравнадзора от 20.09.2011 г. № 5977-Пр/11
РУ № ФСР 2011/11918 от 20.09.2011 г.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для кинетического фотометрического определения активности α -амилазы в сыворотке, плазме крови и моче в клинико-диагностических лабораториях и в научно-исследовательской практике. Набор рассчитан на 50, 100, 125, 250 и 500 определений при конечном объеме реакционной смеси 1 мл.

ПРИНЦИП МЕТОДА

α -Амилаза катализирует реакцию расщепления субстрата 4,6- γ -этилен-(G7)-*n*-нитрофенил-(G1)- α -D-мальтогептазида (EPS-G7) на различные фрагменты, которые затем расщепляются в присутствии α -глюкозидазы с образованием глюкозы и *n*-нитрофенола. Скорость образования *n*-нитрофенола пропорциональна активности α -амилазы.

СОСТАВ НАБОРА

Реагент 1 (P1). HEPES-буфер – 52 ммоль/л, α -глюкозидаза – 9000 Е/л, NaCl – 87,5 ммоль/л, CaCl₂ – 1,25 ммоль/л, консерванты, стабилизаторы

Реагент 2 (P2). HEPES-буфер – 52 ммоль/л, EPS-G7 – 6 ммоль/л, консерванты, стабилизаторы

Кат.№	Фасовка
V-10261	P1 1x40 мл + P2 1x10 мл
V-10262	P1 1x80 мл + P2 1x20 мл
V-10264	P1 5x20 мл + P2 1x25 мл
V-10265	P1 1x200 мл + P2 1x50 мл
V-10263	P1 5x80 мл + P2 1x100 мл

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность – не более 40 Е/л.

Линейность – от 50 до 1000 Е/л с отклонением не более 5%.

Коэффициент вариации – не более 5%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

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

В состав реагентов в качестве консерванта входит азид натрия. При попадании реагентов на кожу и слизистые следует промыть поражённое место большим количеством проточной воды.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Анализаторы открытого типа различных изготовителей, дозаторы, позволяющие отбирать объёмы 0,02, 0,1-1,0 мл, термостат, секундомер, дистиллированная вода.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Сыворотка крови, свободная от гемолиза, гепаринизированная или ЭДТА-плазма, моча.

α -Амилаза стабильна в сыворотке и плазме крови в плотно закрытой пробирке при 2-25°C в течение 7 суток, при -20°C в течение года. α -Амилаза стабильна в моче в плотно закрытой пробирке при 18-25°C в течение 2 суток, при 2-8°C в течение 10 суток, при -20°C в течение 3 недель [1].

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

Приготовление монореагента для схемы 1

Смешать необходимые количества реагентов 1 и 2 в соотношении 4:1. Полученный монореагент стабилен в течение 3 дней при температуре 2-8°C.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Длина волны 405 нм.

Кювета с длиной оптического пути 10 мм.

Температура проведения реакции 37°C.

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

Схема 1. Запуск реакции образцом

Раствор	Опытная проба
Монореагент, мл	1,0
<i>Инкубировать 5 мин. при температуре 37°C.</i>	
Образец, мл	0,02
<i>Пробы тщательно перемешать. Через 180 с измерить оптическую плотность опытной пробы (E₁). Через 60 с повторить измерение (E₂).</i>	

Рассчитать изменение оптической плотности за минуту (E₂ - E₁).

Схема 2. Запуск реакции реагентом 2

Раствор	Опытная проба
Реагент 1, мл	0,8
Образец, мл	0,02
<i>Перемешать, инкубировать 5 мин. при температуре 37°C.</i>	
Реагент 2, мл	0,2
<i>Пробы тщательно перемешать. Через 180 с измерить оптическую плотность опытной пробы (E₁). Через 60 с повторить измерение (E₂).</i>	

Рассчитать изменение оптической плотности за минуту (E₂ - E₁).

РАСЧЁТ

1. Активность **A** α -амилазы в сыворотке (плазме) крови рассчитать по формуле:

$$A = 4554 \cdot (E_2 - E_1)$$

2. Активность **A** α -амилазы в моче рассчитать по формуле:

$$A = 4248 \cdot (E_2 - E_1)$$

В формулах приведены теоретические факторы, рассчитанные с коэффициентом молярной экстинкции *n*-нитрофенола в HEPES-буфере, рН 7,15 при температуре 37°C [2]. Значение факторов для вашего анализатора необходимо уточнить по мультикалибраторам, контрольным сывороткам, контрольной моче, аттестованным IFCC-методом для α -амилазы с субстратом EPS-G7. Возможное отличие практического фактора от теоретического вызвано различиями в технологии производства оптических систем анализаторов.

КлиниТест-Альфа-Амилаза

ПАРАМЕТРЫ ДЛЯ БИОХИМИЧЕСКИХ АНАЛИЗАТОРОВ

Тип анализатора	Любой
Метод измерения	Кинетика
Длина волны, нм	405
Измерение против	Воздуха или дистилл. воды
Температура реакции	37°C
Единица измерения	Е/л
Число знаков после запятой	0
Изменение оптической плотности	Увеличивается
Фактор	4554*
Соотношение реагент/проба	50:1
Количество измерений, не менее	3
Время преинкубации, сек.	180
Время реакции, сек.	60
Предел максимальной абсорбции Δ Е/мин.	0,35
Границы линейности, Е/л	50-1000
Максимум нормы, Е/л	100*
Минимум нормы, Е/л	-

*Для сыворотки, плазмы крови.

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

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Значения факторов для вашего анализатора необходимо уточнить. См. РАСЧЁТ.
2. Если активность α -амилазы выше 1000 Е/л, образец следует развести физраствором в 10 раз, анализ повторить, величину рассчитанной активности умножить на 10.

НОРМАЛЬНЫЕ ВЕЛИЧИНЫ

Сыворотка, плазма	до 100 Е/л
Моча	до 500 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). Реагенты после вскрытия флаконов можно хранить при температуре 2-8°C в течение всего срока годности набора.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Обеспечение качества лабораторных исследований. Преаналитический этап. Под ред. В.В. Меньшикова, М., 1999, «Лабинформ».
2. Lorentz K. Approved recommendations for IFCC Methods for the Measurement of Catalitic Concentration of Enzyme Part 9. IFCC Method for α -Amylase (1,4- α -Glucan-4-Glucanohydrolase, ES 3.2.1.1). Clin. Chem.lab. Med 1998; 36:185-203.