

«ПОГОДЖЕНО»

Перший заступник голови Державної
служби України з лікарських засобів

09 листопада 2012 р.

І.Б. Демченко

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Головний лікар клінічної лікарні „Феофанія”
Державного управління справами

30 жовтня 2012 р.

І.П. Семенів

Код за НК 024:2023 – **52940**

ТУ У 24.4-24607793-017-2003

ІНСТРУКЦІЯ ДО НАБОРУ РЕАКТИВІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ АЛЬФА-АМІЛАЗИ У БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ КІНЕТИЧНИМ ОПТИМІЗОВАНИМ МЕТОДОМ

ПРИЗНАЧЕННЯ**IVD**

Набір призначений для кількісного визначення активності α -амілази у біологічних рідинах в клініко-діагностичних, біохімічних лабораторіях і науково-дослідницькій практиці.

Набір розрахований на відповідну кількість визначень активності α -амілази (Див. *Примітку 3*)

REF	мікро	напівмікро	макро	REF	мікро	напівмікро	макро
<u>HP003.02</u>	50	25	12	<u>HP003.03</u>	100	50	25
<u>HP003.04</u>	500	250	125				

Діапазон визначаємих активностей - від 7 МОд/л до 2000 МОд/л.

Коефіцієнт варіації у серії - не більше 5 %.

Чутливість ¹⁰ на 0,001 од. оптичної щільності/хв – не більше 4 МОд/л (405 нм).

Зберігання набору - при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С.

Гарантійний термін придатності набору - 12 місяців від дня виготовлення.

Набір призначений для застосування *in vitro* тільки кваліфікованим лабораторним персоналом.

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Під дією α -амілази синтетичний субстрат CNP-G3 (олігосахарид, мічений галогенізованим похідним пара - нітрофенолу) гідролізується з утворенням вільного галогенізованого похідного пара - нітрофенолу, що має максимум поглинання при довжині хвилі 405 нм. Вимірюваний за одиницю часу приріст оптичної щільності реакційної суміші прямо пропорційний активності α -амілази в дослідному зразку. Особливістю даного субстрату, що відрізняє його від інших синтетичних субстратів α -амілази, є одностадійність ферментативного гідролізу і практично ідентична його афінність до активних центрів різних ізоформ α -амілази, що істотно підвищує коректність і відтворюваність отриманих результатів.

СКЛАД НАБОРУ**1. Реагент на α -амілазу рН (6,0 $\pm$ 0,1)**

- MES – 50 ммоль/л;
- CaCl₂ – 2 ммоль/л;
- NaCl – 100 ммоль/л.
- CNP-G3 – 5 ммоль/л;

HP003.02 - 1 флакон з (50 $\pm$ 2) мл;

HP003.03 - 2 флакони по (50 $\pm$ 2) мл;

HP003.04 - 5 флаконів по (100 $\pm$ 2) мл;

ЗРАЗОК

Сироватка крові, Li- або Na-гепаринізована плазма. Гемоліз неприпустимий. Центрифугувати кров щонайшвидше. Зразки стабільні при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С до 7 діб ¹¹.

Сеча. Зразки нестабільні в кислому середовищі. Довести кислотність зразка до значення рН 7 перед зберіганням. Зберігати при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С не більше 7 діб ^{1,7}.

ОБЛАДНАННЯ

1. Фотометричне обладнання, здатне вимірювати оптичну щільність розчинів при довжині хвилі **405 (400-415) нм** у діапазоні (0-1,0) од. опт. щільності та довжині оптичного шляху 10 мм (**Можливо використання автоматичного аналізатора. Інструкція для автоматичного аналізатора висилається за замовленням споживача.**)
2. Водяний термостат або баня, яка забезпечує інкубацію пробірок при температурі плюс (37,0 $\pm$ 0,3) °С.
3. Пробірки місткістю 10 мл (згідно з чинними нормативними документами).
4. Піпетки місткістю 0,1 та 5 мл (ДСТУ EN ISO 835:2018).

ПРИГОТУВАННЯ РОБОЧИХ РОЗЧИНІВ

Рреагент на α -амілазу. Придатний до використання. Розчин стабільний після першого розкриття оригінальної упаковки протягом 8 тижнів при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С. Ретельно закривайте флакон безпосередньо після кожного використання реактиву. **Розчин світлочутливий.** Максимальна екстинкція Реагенту на α -амілазу проти води при 405 нм - 0,4 од. опт. щільності.

ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

Аналіз проводиться у відповідності зі схемою, наведеною в таблиці 1.

Таблиця 1

Температура	плюс 37 °С		
Піпетувати, мкл	макро	напівмікро	мікро
Реагент на α-амілазу	4000	2000	1000
Сироватка або плазма	80	40	20
Реагент на α-амілазу	4000	2000	1000
Сеча	40	20	10

Витримати **Реагент на α-амілазу** до вибраної температури проведення аналізу 3 хв (для 1 мл, якщо більше, то 5 хв) у кюветі. Введіть аналізуємий матеріал в **Реагент на α-амілазу**, ретельно перемішайте та через 1 хв зчитуйте екстинцію (E_1) по відношенню до повітря або дистильованої води. Потім зчитуйте екстинцію (E_2) ще через 3 хв по відношенню до повітря або дистильованої води. Розрахуйте середнє змінення екстинції за 1 хв. ($\Delta E/\text{хв}$).

$$\Delta E = (E_1 - E_2) / 3$$

Фотометрування – див. розділ «Обладнання».

РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Розрахунок активності α-амілази ведуть за формулами (1) для сироватки (плазми) або (2) для сечі.

$$\text{Активність } \alpha - \text{амілази (у сироватці або плазмі)} = \Delta E / \text{хв} \times 3954 \times K, \text{ МОд/л} \quad (1)$$

$$\text{Активність } \alpha - \text{амілази (у сечі)} = \Delta E / \text{хв} \times 7908 \times K, \text{ МОд/л, де} \quad (2)$$

K - коефіцієнт розведення зразка (якщо він був розведений);

3954 та 7908 - відповідні фактори перерахунку (приведені для 2-хлор-4-нітрофенолу), МОд/л.

НОРМАЛЬНІ МЕЖІ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТУ ПРИ 37 °С

Сироватка, плазма крові ² - до 98 МОд/л;

Сироватка, плазма крові ⁹ - від 20 до 104 МОд/л;

Сеча ² - до 450 МОд/л

Добова сеча ² - до 400 МОд/л

Дані величини орієнтовні, відповідно до правил GLP (Належної Лабораторної Практики) рекомендується визначення власних нормальних величин в кожній лабораторії, характерних для обстежуваного контингенту.

ПРИМІТКИ

1. Якщо активність α-амілази в зразку 2000 МОд/л, його розбавляють у 10 раз фізіологічним розчином. Аналіз повторюють з урахуванням коефіцієнту розведення 10.

2. Активність фермента α-амілази залежить від температури. Аналіз, що виконується при температурі менше плюс 37 °С або більше плюс 37 °С, показує відповідне зменшення або збільшення величини активності.

3. Розраховано при витраті розчинів реагентів 1,0 мл (мікро-), 2,0 мл (напівмікро-), 4,0 мл (макро-). Витрату реактивів можна масштабувати, відповідно до аспіраційного об'єму кювети аналізатора, виходячи з постійного співвідношення:

Реагент на α-амілазу : Сироватка або плазма = 50 : 1.

Реагент на α-амілазу : Сеча = 100 : 1.

УВАГА! Постійно пам'ятайте про те, що слина і поверхня шкіри людини містять даний фермент у великій кількості. Щоб уникнути отримання хибнопозитивних результатів використовуйте на всіх стадіях преаналітичної підготовки проб і самого аналізу респіратори і рукавички.

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Для контролю ходу реакції та процедури вимірювання рекомендується використовувати контрольні сироватки із значеннями активності, визначеними даним методом. Наприклад: Diacon N, Diacon P (Австрія), TruLab N, TruLab P (Німеччина), "ФілоНорм" або „ФілоПат” (Україна).

При будь-яких дослідженнях атестованих контрольних сироваток як референтне значення можливо застосовувати дані, вказані для методів з вивільненням пара-нітрофенолу з субстрату, отримані при температурі плюс 37 °С.

Якщо значення контролю виходять за межі встановленого діапазону, перевірте обладнання, реактиви та можливі технічні проблеми.

Кожна лабораторія повинна встановити власну внутрішню систему контролю якості та коригуючі дії, якщо контроль не відповідає допустимим нормам.

ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

α -Амілаза каталізує гідроліз α - 1,4 - зв'язку молекул α -D-глюкози. В результаті утворюються декстрини, мальтоза і молекули глюкози.

α -Амілаза синтезується екзокринною частиною підшлункової залози (Р-тип) і слинними залозами (S-тип), виявляється вона і в інших тканинах організму.

Оцінка активності амілази в сироватці і сечі широко застосовується для діагностики захворювань підшлункової залози.

Збільшення активності α -амілази є високоспецифічним при гострому і хронічному панкреатиті. Окрім цього, гіперамілаземія може бути викликана нирковою недостатністю, гострими станами черевної порожнини, пухлинами легенів і яєчників, патологією слинних залоз, макроамілаземією, кетоацидозом, захворюваннями жовчовивідних шляхів, травмою мозку, хронічним алкоголізмом і споживанням опіатів^{3,8}.

Зниження активності α -амілази вказує на екзогенну недостатність підшлункової залози при атрофії ацинарної тканини і фіброзі органу у хворих, тривало страждаючих даним захворюванням.

1. Сироватка крові:

Активність α -амілази у дітей перших двох місяців низька; вона підвищується до рівня дорослих до кінця першого року життя.

↑. Паротит, панкреатит, обтураційна і стангуляційна непрохідність або інфаркт кишки, ектопічна вагітність, перфорація статевих органів, захворювання жовчних шляхів всіх типів, діабетичний кетоацидоз, кіста або псевдокіста підшлункової залози, перитоніт, макроамілаземія, деякі пухлини легенів і яєчників, ниркова недостатність, ендоскопічна ретроградна холангіопанкреатографія, абдомінальна травма, пошкодження черепа, вірусні інфекції, стани після операції, алкоголь.

↓. Недостатність підшлункової залози, виражений муковісцидоз, важке ураження печінки, панкреоектомія.

2. Сеча добова:

Див. Сироватка крові. Проте, значення можуть бути нормальними або зниженими при нирковій недостатності макроамілаземії. Амілаза в сечі може залишатися підвищеною протягом 2 тижнів після нападу гострого панкреатиту і може передбачити утворення псевдокісти.

Клінічний діагноз повинен встановлюватися на основі інтеграції клінічних і лабораторних даних.

ПАРАМЕТРИ ПРОГРАМУВАННЯ

Найменування набору реактивів	α -Амілаза КІН (Сироватка, плазма крові)	α -Амілаза КІН (сеча)
Тип аналізатора (напівавтомат/автомат)	будь-який	будь-який
Метод виміру	Кінетика	Кінетика
Зміна оптичної щільності	Збільшується	Збільшується
Довжина хвилі, нм	405	405
Вимір проти	повітря	повітря
Температура реакції, °C	37	37
Чинник	3954	7908
Концентрація стандарту	-	-
Співвідношення реагент/проба (мкл/мкл)	1000 : 20	1000 : 10
Кількість вимірів, не менше	3	3
Час передінкубації, с	60	60
Час реакції, с	60	60
Одиниці виміру	МОд/л	МОд/л
Верхня межа абсорбції контрольної проби, А	0,5	0,5
Нижня межа абсорбції контрольної проби, А	0	0
Максимально допустиме ΔE /хв, А	0,5	0,25
Межі лінійності	0-2000	0-2000
Максимум норми	104	450
Мінімум норми	20	0
Підтвердження лінійності (так/ні)	так	так

ІНТЕРФЕРЕНЦІЯ

Ліпемія (тригліцериди 26 г/л), гемоглобін до 5 г/л та білірубін до 500 мг/л не заважають визначенню^{3,4}.

Проведенню аналізу перешкоджають: цитрати, як антикоагулянт. Гемоліз перешкоджає проведенню аналізу¹. Зразки з вмістом гемоглобіну вище верхньої межі можуть бути розведені (1 частина зразка з 1 частиною фізіологічного розчину). Помножте результат на два, щоб урахувати розведення.

Виробник залишає за собою право вносити зміни без попереднього повідомлення. Дата останньої перевірки **09.02.2024**

На хід визначення можуть впливати деякі ліки і речовини ^{3,4}.

УТИЛІЗАЦІЯ

Всі зразки для аналізу вважають за матеріал, який може бути інфікований, і разом з можливими залишками реактивів підлягає знищенню відповідно до затверджених внутрішньолікарняних правил.

Паперову упаковку здайте в макулатуру, виполоскану тару - в сортоване сміття.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ying Foo A et al. Amylase measurement with 2-chloro-4nitrophenyl maltotrioside as substrate. Clin Chim 272, 1998; 137-147.
2. McNeely M. Amylase. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1112-1116.
3. Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
4. Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
5. Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
6. Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.
7. Энциклопедия клинических лабораторных тестов (под ред. Н.У.Тица). «Лабинформ», Москва, 1997, стр.21-22.
8. McCroskey, R., Chang, T., David, H. and Winn, E., Clin. Chem. 28:1787, (1982).
9. Alan, H.B., Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests, 4th Ed., W.B. Saunders (2006).
10. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997).
11. Guder WG, Zawta B et al. The quality of Diagnostic Samples. 1st ed. Darmstadt: GIT Verlag; 2001; p. 16-17, 50-51.



ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика»,
Україна, 49051 м. Дніпро, вул. Каштанова, 32
Тел./факс: (056) 747-47-76, 747-45-34
Тел.: (093) 573-75-35, (067) 535-15-73, (095) 168-36-54
E-mail: filicit@ukr.net <http://www.felicit.com.ua>