1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

1.1 Набор ФЛА$_2$-ФОА предназначен для определения активности панкреатической фосфолипазы A_2 (ФЛА$_2$) в сыворотке крови человека методом спектрофотометрии с использованием гемоглобина в качестве индикатора. Набор предназначен для применения только in vitro.

1.2 ФЛА$_2$ – белок с молекулярной массой 14 кДа, является пищеварительным ферментом поджелудочной железы, продуцируется ацинарными клетками и необходим для пищеварения фосфолипидов: фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и т.д. Повышение активности панкреатической ФЛА$_2$ в крови является следствием структурно-функциональных изменений поджелудочной железы и наблюдается при различных ее заболеваниях.

В клинике определение активности панкреатической ФЛА$_2$ может быть использовано для раннего выявления панкреатита, для определения степени тяжести заболевания и контроля за эффективностью его лечения.

1.3 Присутствие различных медикаментов в сыворотке крови может оказывать влияние на результаты определения активности ФЛА$_2$.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Состав набора:

Концентрат буферного раствора, 50 мл, 1 флакон.

Кофактор ФЛА$_2$ (ионы Ca^{2+}), 3 мл, 1 флакон.

Раствор смешанных мицелл субстрата (ДМФХ) и детергента дезоксихолата (ДОХ), 3,0 мл, 1 флакон.

Лиофильно высушенный гемоглобин – 1 флакон.

Миристиновая кислота (МК) разных концентраций в составе сложных мицелл с ДМФХ-ДОХ для построения калибровочного графика (0,12; 0,24; 0,48; 0,72; 0,96; 1,2 мМ) – 6 флаконов.

2.2 Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 30 неизвестных проб, всего 60 определений.

2.3 Продолжительность анализа 3 ч. Диапазон определяемой активности ФЛА$_2$ (1 - 100) МЕ/л.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 При работе с набором следует соблюдать правила работы с химическими веществами.

3.2 При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как данный набор содержит производные крови человека, которые следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные сохранять ВИЧ вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

3.3 Работы проводить с соблюдением мер предосторожности в соответствии с требованиями [1], [2], [3], [4]. В случае пролива растворов на рабочие поверхности, необходимо проводить дезинфекцию в соответствии с требованиями [5].

3.4 При работе с набором рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

3.5 Соблюдать правила работы с химическими веществами. При попадании на кожу или в глаза смыть большим количеством воды.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

3.6 Все отработанные растворы, подлежащие утилизации, необходимо обрабатывать 6 % раствором перекиси водорода и выдерживать при комнатной температуре в течение 3 ч.

3.7 Все твердые отходы необходимо собирать в специальный контейнер и автоклавировать в течение 1 ч при температуре (126±2) °С и давлении (0,15±0,02) МПа.

3.8 Инструменты, оборудование, а также рабочие поверхности столов необходимо обрабатывать 70 % этиловым спиртом либо дезинфицирующими средствами.

4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

4.1 Для проведения анализа необходимо использовать следующее оборудование:

- спектрофотометр одно (двух) лучевой, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в пластиковой кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны 423 нм;
- термостат, поддерживающий температуру (37±1) °С, (60±1) °С;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкостей в диапазонах 2-20 мкл, 20-100 мкл, 100-1000 мкл и 1000-5000 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность должна быть не более 3 %);
- пробирки пластмассовые (стеклянные) вместимостью 10 мл;
- стакан стеклянный вместимостью 100 мл, 1шт;
- цилиндр мерный на 100 мл;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- вода дистиллированная;
- бумага фильтровальная.

5 ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ НАБОРА

5.1 Перед проведением анализа компоненты набора необходимо выдержать при комнатной температуре (18-25) ºС в течение 30 мин.

5.2 Для того чтобы приготовить рабочий буферный раствор (БР), его концентрат из флакона количественно переносят в мерную колбу или цилиндр объемом 250 мл, добавляют дистиллированную воду до метки, перемешивают, избегая вспенивания.

5.3 Приготовление раствора гемоглобина (100 мкМ).

Лиофильно высушенный гемоглобин из флакона растворить в 12,6 мл БР. Оставить для набухания на 15-30 минут, перемешать стеклянной палочкой, центрифугировать при 3000 об/мин на напольной центрифуге в течение 5 минут.

5.4 Приготовление реакционной среды для построения калибровочного графика.

Для построения калибровочной кривой готовится реакционная смесь, состоящая из 1210 мкл 100 мкМ гемоглобина и 22990 мкл БР. Реакционную смесь разлить на 6 пар кювет по 2 мл, разница оптической плотности между которыми не должна превышать 0,002 ОЕ при пустых кюветах. Проверить экстинкцию образцов

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

после добавления реакционной смеси, если кюветы до этого использовались, поскольку тест очень чувствителен.

5.5 Приготовление реакционной среды для определения активности $ФЛА_2$ в сыворотке крови одного больного (СБ). Сыворотку перед началом анализа следует проинкубировать в течении 45 мин при 60 ºС для инактивирования термолабильных, не связанных с панкреатитом, изоформ $ФЛА_2$.

Определение активности $ФЛА_2$ в сыворотке крови проводят в двух параллельных пробах: для концентраций сыворотки крови 30 мкл и 50 мкл на 1 мл реакционной смеси. Для этого в одной центрифужной пробирке следует смешать следующие объемы: 3822 мкл БР, 42 мкл 0,1М $CaCl_2$, 210 мкл раствора гемоглобина и 126 мкл сыворотки крови больного (конечная концентрация сыворотки в реакционной смеси 30 мкл СБ/мл). В другой центрифужной пробирке следует смешать 3738 мкл БР, 42 мкл 0,1М $CaCl_2$, 210 мкл раствора гемоглобина и 210 мкл сыворотки крови больного (конечная концентрация 50 мкл СБ/мл). Реакционную смесь хорошо перемешать и разлить в 2 пары кювет по 2 мл.

5.6 Приготовление реакционной среды для определения активности $ФЛА_2$ в сыворотке крови одного здорового донора (СД).

Для определения активности также используется термоинактивированная сыворотка крови (см. п.5.5.). При низкой активности $ФЛА_2$, которая характерна для сыворотки крови здорового человека, рекомендуется проводить исследование в 3-х параллельных пробах СД: 30, 50 и 90 мкл/мл реакционной смеси.

Для определения активности $ФЛА_2$ в 3-х параллельных пробах одной и той же СД в 3-х центрифужных пробирках следует смешать следующие объемы:1) 3822 мкл БР, 42 мкл 0,1М $CaCl_2$, 210 мкл раствора гемоглобина и 126 мкл СД; 2) 3738 мкл БР, 42 мкл 0,1М $CaCl_2$, 210 мкл раствора гемоглобина и 210 мкл СД; 3) 3570 мкл БР, 42 мкл 0,1М $CaCl_2$, 210 мкл раствора гемоглобина и 378 мкл СД. Реакционную смесь хорошо перемешать и разлить в 3 пары кювет по 2 мл. Для расчета используются значения экстинкции A_{423} тех проб, которые образуют вместе с 0 прямую линию.

6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1 Из флакона с мицеллами субстрата отобрать и добавить в опытную кювету 50 мкл, одновременно вместо мицелл в кювету сравнения добавить 50 мкл БР. Кюветы поместить в термостат (37 ºС) на 60 минут. Снять показания на спектрофотометре при длине волны 423 нм в опытной кювете против соответствующего контроля. Возвратить кюветы в термостат. Повторить измерение экстинкции в этих же кюветах через 100 минут от начала реакции.

7 РАСЧЕТЫ И ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ

7.1 Рассчитать средние арифметические значения ΔD для каждой пары кювет.

Для расчета активности $ФЛА_2$ в пробе сыворотки крови используют тангенс (tg) угла наклона кривой, полученной на графике, который представляет собой коэффициент k в линейном уравнении зависимости ΔA от концентрации МК.

7.2 Построить калибровочные графики для 30, 60 и 100 минут реакции, откладывая на оси ординат значения величины ΔA_{423}, а по оси абсцисс - значения концентраций МК в нмоль/ мл в соответствующих калибровочных пробах.

7.3 Определить по калибровочному графику концентрацию МК в исследуемых пробах сыворотки крови.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.4 Рассчитать в международных единицах (МЕ/л) активность панкреатической $ФЛА_2$ в исследуемых образцах сыворотки по формуле (1):

$$Акт\ (МЕ/л) = 1000\ A_{423}/\ n\ (мкл) \cdot k \cdot t\ (мин) \qquad (1)$$

где k – коэффициент линейного уравнения, найденный по калибровочному графику,

t – время реакции (60 или 100 минут),

A_{423} – значение A_{423}, полученное к этому времени, n–концентрация сыворотки (мкл) на 1 мл реакционной смеси,

1000 – пересчет на 1 мл сыворотки.

Примечание – Поскольку концентрация МК на калибровочном графике выражена в нмоль МК, перевод в мкмоль (1 единица активности) и пересчет на 1 л крови взаимно сокращаются.

Одна международная единица активности $ФЛА_2$ (МЕ/л) соответствует количеству мкмоль/л продукта (миристиновой кислоты), полученного при гидролизе субстрата (синтетического димиристоилфосфатидилхолина, ДМФХ) сывороточной $ФЛА_2$ за 1 мин.

7.5 Интерпретация результатов: для здорового человека нормальной считается активность $ФЛА_2$ до 2 МЕ/л. Для сыворотки больных панкреатитом значения активности от 2,2 МЕ/л и выше.

8 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

8.1 Специфичность.

В наборе используется субстрат (димиристоилфосфатидилхолин) в составе отрицательно заряженной мицеллярной фазы, к которой специфична панкреатическая $ФЛА_2$.

8.2 Чувствительность.

Минимальная активность панкреатической $ФЛА_2$, определяемая с помощью набора, составляет не более 5 МЕ/л.

8.3 Воспроизводимость результатов.

Коэффициент вариации результатов определения (n=10) активности $ФЛА_2$ в образцах сыворотки крови с низким, средним и высоким содержанием $ФЛА_2$ с использованием набора не превышает 10 %.

8.4 Тест на «открытие».

Процент «открытия» активности $ФЛА_2$, добавленной в образцы сыворотки крови с известной концентрацией $ФЛА_2$ составляет (80-120) %.

8.5 Клиническая проверка набора.

При использовании набора активность $ФЛА_2$ в сыворотке крови здоровых лиц обоего пола находится в диапазоне (0-2 МЕ/л), составляя в среднем 1 МЕ/л.

Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить значения активностей $ФЛА_2$ соответствующие нормальным.

9 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

9.1 Компоненты набора $ФЛА_2$-ФОА должны храниться при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности набора. Срок годности набора - 6 месяцев со дня выпуска.

9.2 Не следует держать реактивы на ярком свету во время хранения и инкубации.

9.3 Не смешивать реактивы из разных серий. Не использовать компоненты наборов по истечении срока годности.

9.4 Определение активности $ФЛА_2$ с помощью набора «$ФЛА_2$-ФОА» проводят в сыворотке крови. Образцы сыворотки крови хранят при температуре 0 °С на ледяной бане (в термосе) (2-8) °С, если анализ проводится в течение 48 часов после взятия крови. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре минус 20 °С в течение более длительного времени. Допускается только однократное замораживание и оттаивание образцов. Размораживание образцов проводится при температуре (8-10) °С (холодная вода).

Образцы сыворотки крови с предполагаемым высоким уровнем активности $ФЛА_2$ рекомендуется разводить.

9.5 Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную сыворотку крови, мутную сыворотку, а также сыворотку с повышенным содержанием липидов.

Пояснения к символам

Графический символ	Его значение и объяснение
SN	**Серийный номер** Настоящий символ сопровождается указанием серийного номера изготовителя
	**Использовать до** Настоящий символ сопровождается датой, указывающей, что изделие рекомендуется использовать до истечения установленного срока; дата состоит из четырех цифр, указывающих год, двух цифр, указывающих месяц, и двух цифр, указывающих день
IVD	**Изделие для диагностики in vitro**
	**Ограничение температуры** Рядом с верхней и нижней горизонтальными линиями указывается верхняя и нижняя границы температурного диапазона
	**Изготовитель** Настоящий символ сопровождается информацией о наименовании и адресе изготовителя
	**Содержимого достаточно для проведения n-тестирований** Настоящий символ сопровождается указанием количества определений

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси» ул. Академика В.Ф.Купревича, д.5, корп.3, 220141, г. Минск, Республика Беларусь
Тел./факс +375-17-272-52-57 E-mail: hopmang.bel@gmail.com
http://www.hopiboh.org

По вопросам, касающимся качества набора, обращаться в ОТК, тел. +375-17-396-87-38

Библиография

[1] Сборник нормативных документов по проблеме ВИЧ/СПИД. Утвержден приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 16.12.1998 г № 351

[2] СП 17-69 РБ-98
«Общие требования по профилактике инфекционных и паразитарных заболеваний», утвержденные постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 29.04.1998 г № 18 (ред. от 03.04.17)

[3] Постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 06.01.2017 № 2 об утверждении Санитарных норм и правил "Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки"

[4] Санитарные нормы и правила «Требования к организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на предупреждение возникновения и распространения вирусных гепатитов», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 06.02.2013 г. № 11

[5] Приказ Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 25.11.2002 г № 165
«О проведении дезинфекции и стерилизации в учреждениях здравоохранения»

Инструкция составлена сотрудниками УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси»:

Начальник научно-технического отдела, к.б.н. А.И.Щербань

Инженер-технолог 2 категории Т.А.Бараненко

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru