

«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

REF № HP001.01

ТУ У 24.4-24607793-017-2003

**ІНСТРУКЦІЯ ДО НАБОРУ РЕАКТИВІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ  
АЛАНІНАМІНОТРАНСФЕРАЗИ У СИРОВАТЦІ КРОВІ (МЕТОД  
РАЙТМАНА-ФРЕНКЕЛЯ)**



**ПРИЗНАЧЕННЯ**

Набір використовується для визначення активності аланінамінотрансферази у сироватці крові людини в клініко-діагностичних, біохімічних лабораторіях та науково-дослідницькій практиці.

Набір розрахований на **60 макровизначень** або **250 мікровизначень** (з урахуванням холостих проб).

Лінійність повинна забезпечуватись в діапазоні від 0,1 мкмоль/(год×мл) до 2,5 мкмоль/(год×мл) (від 0,028 мккат/л до 0,7 мккат/л).

Коефіцієнт варіації визначення - не більше 6 %.

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* професійно навченим лаборантом.

**ПРИНЦИП МЕТОДУ**

Внаслідок амінування 2-оксоглутарової кислоти L-аланіном, яке відбувається під дією аланінамінотрансферази, утворюються L-глутамінова та піровиноградна кислоти. Визначення базується на вимірюванні оптичної щільності 2,4-дінітрофенілгідразонів 2-оксоглутарової та піровиноградної кислот в лужному середовищі. Оскільки гідразон піровиноградної кислоти має більш високий коефіцієнт молярної екстинції, то спостерігається прямо пропорційна залежність оптичної щільності реакційного розчину від активності фермента.

**СКЛАД НАБОРУ**

1. Субстратно-буферний розчин АЛАТ – 1 флакон з (50 ± 2) мл;
  - фосфатний буфер (0,100 ± 0,005) моль/л,
  - D,L-альфа-аланін (0,20 ± 0,01) моль/л,
  - 2-оксоглутарова кислота (2,0 ± 0,1) ммоль/л.
2. Стоп-реагент – 1 флакон з (50 ± 2) мл;
  - 2,4-дінітрофенілгідразин (1,00 ± 0,05) ммоль/л
3. Калібрувальний розчин – 1 ампула з (5,0 ± 0,5) мл;
  - піровинограднокислового натрію (2,0 ± 0,1) ммоль/л,  
(220 ± 11) мкг/мл, (що відповідає 176 мкг/мл піровиноградної кислоти)
4. Гідроокис натрію розчин (4,0 ± 0,2) моль/л чи сухий – 1 флакон з (50 ± 2) мл  
(ОБЕРЕЖНО, ЇДКА РЕЧОВИНА!) або з (8,00 ± 0,32) г.

**ЗРАЗОК <sup>1)</sup>**

**Сироватка.** Матеріал стабільний протягом 3 діб при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С. Якщо зберігати сироватку при кімнатній температурі, активність ферментів знижується. Активність ферменту в сироватці знижується після 3 діб зберігання при температурі від плюс 18 °С до плюс 25 °С - на 10%. Сироватку слід зберігати при температурі від мінус 8 °С до мінус 20 °С. УНИКАТИ ГЕМОЛІЗУ!

## ОБЛАДНАННЯ

1. Фотометричне обладнання, здатне вимірювати оптичну щільність розчинів при довжині хвилі (500-550) нм в діапазоні (0-1,0) од. опт. щільності та довжині оптичного шляху 5 мм або 10 мм. Можливо використання аналізаторів типу ФП («Labsystems»).
2. Водяний термостат або автоматична водяна баня, які здатні підтримувати температуру (плюс  $37 \pm 1$ ) °С (можливо використання сухоповітряного термостата з механічною циркуляцією повітря).
3. Колба мірна місткістю 500 мл, пробірки місткістю 10 мл (ГОСТ 1770-74).
4. Піпетки місткістю 1; 0.1 і 5 мл (ГОСТ 29227-91).

## ПРИГОТУВАННЯ РОБОЧИХ РОЗЧИНІВ

1. **Розчин гідроокису натрію.** Вміст флакону з гідроокисом натрію кількісно переносять до мірної колби на 500 мл, доводять розчин до мітки дистильованою водою. Потім переносять у поліетиленовий посуд, що герметично закривається. Розчин стабільний протягом 4-х тижнів при зберіганні при кімнатній температурі.
2. **Калібрувальний розчин.** Придатний до використання, після відкупорювання дозволяється його зберігання при кімнатній температурі протягом 12 годин.
3. **Субстратно -буферний розчин.** Придатний до використання, після відкупорювання флакону дозволяється його зберігання від плюс 2 °С до плюс 10 °С протягом 4-х тижнів.
4. **Стоп - реагент.** Придатний до використання. Розчин стабільний до закінчення гарантійного терміну придатності (при дотриманні умов збереження, зазначених на упаковці).

## ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

Аналіз проводиться згідно зі схемою, даною в таблиці 1.

Таблиця 1

Відміряти у пробірку, мл	Макро аналіз		Мікро аналіз	
	Дослідна проба	Холоста проба	Дослідна проба	Холоста проба
Субстратно - буферний розчин	0,40	0,40	0,10	0,10
інкубують <b>3 хв</b> при плюс 37 °С				
Стоп - реагент	-	0,40	-	0,10
Сироватка крові	0,08	0,08	0,02	0,02
інкубують <b>60 хв</b> при плюс 37 °С				
Стоп - реагент	0,40	-	0,10	-
витримують <b>20 хв</b> при кімнатній температурі				
Розчин гідроокису натрію 0,4 Н	4,00	4,00	1,00	1,00
Витримують <b>10 хв</b> при кімнатній температурі. Вимірюють оптичну щільність дослідної проби <b>проти холостої проби</b> (індивідуальної для кожної сироватки). Забарвлення стабільне протягом <b>60 хв</b> . Фотометрування – див. розділ «Обладнання». Розрахунок активності ферменту у сироватці крові проводять по калібрувальному графіку. (Див. <b>Примітку 4</b> )				

## НОРМАЛЬНІ ВЕЛИЧИНИ

Активність аланінамінотрансферази (0,1-0,68) мкмоль/(год×мл) при плюс 37 °С.

Дані величини орієнтовні, рекомендується визначення власних нормальних величин в кожній лабораторії.

### ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Амінотрансферази каталізують утворення глютамінової кислоти з 2-оксоглютарата шляхом перенесення аміногруп.

У нормі АлАТ присутній в багатьох тканинах, але найбільші концентрації визначаються в печінці і нирках.

Рівень сироваткової АлАТ підвищується при гепатиті та інших захворюваннях печінки, що супроводжуються некрозом гепатоцитів: інфекційному мононуклеозі, холестазі, цирозі, метастатичній карциномі печінки, білій лихоманці і при призначенні різних лікарських засобів, таких як опіати, саліцилати або ампіцилін<sup>2,3</sup>.

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

### КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Для контролю ходу реакції і процедури вимірювання рекомендується використовувати контрольні сироватки зі значеннями, визначеними даним методом. Наприклад: «Ліонорм» (Чехія), «Біоконт С» (Росія), "ФілоНорм" або „ФілоПат” (Україна).

Кожна лабораторія повинна встановити власну внутрішню систему контролю якості.

### ЗАСТЕРЕЖНІ ЗАХОДИ

1. При роботі використовувати гумові рукавички, заборонено їсти, пити, курити.
2. Стоп - реагент - включає соляну кислоту (їдка речовина), 2,4 ДНФГ- (отруйна речовина). Гидроокис натрію - їдка речовина. Калібрувальний розчин включає азид натрію (отруйна речовина).

### ПОБУДУВАННЯ КАЛІБРУВАЛЬНОГО ГРАФІКУ

Таблиця 3 - Калібрувальний графік для 1 години інкубації

Відміряти у пробірку, мл	Калібрувальні крапки					Контрольна проба
	1	2	3	4	5	
Субстратно - буферний розчин	0,475	0,45	0,40	0,35	0,3	0,5
Калібрувальний розчин	0,025	0,05	0,10	0,15	0,2	-
Дистильована вода чи фіз.розчин	0,100	0,10	0,10	0,10	0,1	0,1
Стоп - реагент	0,500	0,50	0,50	0,50	0,5	0,5
Витримують <b>20 хв</b> при кімнатній температурі						
Розчин гідроокису натрію 0,4 Н	5,000	5,00	5,00	5,00	5,0	5,0
Витримують <b>10 хв</b> при кімнатній температурі. Вимірюють оптичну щільність калібрувальної проби <b>проти контрольної проби</b> . Забарвлення стабільне протягом <b>60 хв</b> . Фотометрування – див. розділ «Обладнання». При побудові калібрувального графіка на осі абсцис - величини активності АлАТ, виражені в мікромолях піровиноградної кислоти на 1 мл сироватки за 1 годину інкубації.						
Вміст піровиноградної кислоти в калібрувальній пробі,						
<b>МКМОЛЬ</b>	0,050	0,100	0,200	0,300	0,40	0,0
<b>МКГ</b>	4,400	8,800	17,600	26,400	35,20	0,0
Активність в <b>МКМОЛЬ/(год×мл)</b> ,	0,500	1,000	2,000	3,000	4,00	0,0

мккат/л	0,139	0,278	0,556	0,833	1,11	0,0
---------	-------	-------	-------	-------	------	-----

Лінійність калібрувального графіка повинна зберігатися до величини екстинції 0,25 од.опт. щільності.

### УТИЛІЗУВАННЯ

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

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

### ІНТЕРФЕРЕНЦІЯ

Гемоліз, кетосполуки, аспірин, барбітурати, опіати, пеніцилін завищують результат при визначенні АлАТ.

На хід визначення можуть робити вплив деякі ліки і речовини.

### ПРИМІТКИ

1. Для приготування реактивів застосовується **дистильована вода, яка не містить карбонатів.**
2. Якщо величина екстинції ***вище 0,25*** од.опт. щільності, сироватку слід розбавити в 10 разів якою-небудь інактивованою сироваткою, або 5% розчином альбуміну, що готується на фізіологічному розчині. Результат множать на коефіцієнт розведення (10).
3. **Пробірки, в яких проводиться аналіз, повинні бути ретельно вимиті дистильованою водою від залишків миючих засобів і водопровідної води. У протилежному випадку, можливо одержання негативних (оптична щільність дослідної проби нижче контрольної) або занижених результатів.**
4. **Для кожної нової серії реагентів треба побудувати новий калібрувальний графік.**

### ЛІТЕРАТУРА

1. Reitman S., Frankel S.- Am.J.Clin.Pathol., 1957,28,56.
1. Tietz NW, Clinical guide to laboratory tests, 2nd ed. Saunders Co, 1991.
2. Friedman and Young, Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Press.1997.



СР	2216/2003
09.11.2012	



ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика»,  
Україна, 49051 Дніпропетровськ, 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: felicit\_d@ua.fm <http://www.felicit.com.ua>