

«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)

IVD

ПРИЗНАЧЕННЯ

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

Набір розрахований на **60 макро-, 125 напівмікро- або 250 мікрОВИЗНАЧЕНЬ (з урахуванням холостих проб)** (Див. *Примітку 5*).

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 ¹⁾

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 ± 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 3 хв при плюс 37 °С | | | | |
| Стоп - реагент | - | 0,40 | - | 0,10 |
| Сироватка крові | 0,08 | 0,08 | 0,02 | 0,02 |
| інкубують 60 хв при плюс 37 °С | | | | |
| Стоп - реагент | 0,40 | - | 0,10 | - |
| витримують 20 хв при кімнатній температурі | | | | |
| Розчин гідроокису натрію 0,4 Н | 4,00 | 4,00 | 1,00 | 1,00 |
| Витримують 10 хв при кімнатній температурі. Вимірюють оптичну щільність дослідної проби проти холостої проби (індивідуальної для кожної сироватки). Забарвлення стабільне протягом 60 хв . Фотометрування – див. розділ «Обладнання». Розрахунок активності ферменту у сироватці крові проводять по калібрувальному графіку. (Див. Примітку 4) | | | | |

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

Аміотрансферази 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^{2,3}.

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 20 хв при кімнатній температурі | | | | | | |
| Розчин гідроокису натрію 0,4 Н | 5,000 | 5,00 | 5,00 | 5,00 | 5,0 | 5,0 |
| Витримують 10 хв при кімнатній температурі. Вимірюють оптичну щільність калібрувальної проби проти контрольної проби . Забарвлення стабільне протягом 60 хв . 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, мкмоль | 0,050 | 0,100 | 0,200 | 0,300 | 0,40 | 0,0 |
| мкг | 4,400 | 8,800 | 17,600 | 26,400 | 35,20 | 0,0 |
| Активність в мкмоль/(год×мл), | 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 противному випадку, можливо одержання негативних (оптична щільність дослідної проби нижче контрольної) або занижених результатів.**
4. Для кожної нової серії реагентів треба побудувати новий калібрувальний графік.
5. **Розраховано на загальний об'єм реакційної суміші: 4,88 мл (макро-), 2,44 мл (напівмікро-), 1,22 мл (мікро-). Витрату реактивів можна масштабувати, відповідно до аспіраційного об'єму кювети аналізатора, виходячи з постійного співвідношення:**

Субстратно-буферний розчин : Аналізуємий розчин : Стоп - реагент :
Розчин гідроокису натрію 0,4 N = 5 : 1 : 5 : 50

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. AACCC Press.1997.



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.felicity.com.ua>