

«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 024:2019 – **52924**

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 (з урахуванням холостих та калібрувальних проб) на відповідну кількість визначень (Див. *Примітку 5*).

REF	мікро	напівмікро	макро	REF	мікро	напівмікро	макро
<u>HP001.01</u>	250	125	60	<u>HP001.06</u>	500	250	125
<u>HP001.05</u>	1000	500	250				

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 %.

Чутливість ⁴ на 0,001 од. оптичної щільності – не більше 0,01 мкмоль/(год×мл) (510 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

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
 - 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
 - 2,4-дінітрофенілгідразин (1,00 ± 0,05) ммоль/л
3. Калібрувальний розчин
 - піровинограднокислого 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 (50 ± 2) мл чи сухий (8,00 ± 0,32) г)
(ОБЕРЕЖНО, ЇДКА РЕЧОВИНА!)

HP001.01 - 1 флакон з (50 ± 2) мл;
HP001.05 - 4 флакони по (50 ± 2) мл;
HP001.06 - 2 флакони по (50 ± 2) мл;

HP001.01 - 1 флакон з (50 ± 2) мл;
HP001.05 - 4 флакони по (50 ± 2) мл;
HP001.06 - 2 флакони по (50 ± 2) мл;

HP001.01, HP001.05, HP001.06 -
1 ампула з (5,0 ± 0,5) мл;

HP001.01 - 1 флакон;
HP001.05 - 4 флакони;
HP001.06 - 2 флакони;

ЗРАЗОК ¹

Сироватка. Матеріал стабільний протягом 3 діб при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С або протягом місяця при температурі мінус 20 °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 %. **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 (згідно з чинними нормативними документами).
4. Піпетки місткістю 1; 0.1 і 5 мл (ДСТУ EN ISO 835:2018).

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 ^{2,3}.

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

ПРИГОТУВАННЯ РОБОЧИХ РОЗЧИНІВ

1. **Розчин гідроокису натрію.** Вміст одного 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 зберігання, зазначених на упаковці).

НОРМАЛЬНІ ВЕЛИЧИНИ

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

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

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				
Сироватка крові	0,08	-	0,02	-
інкубують 60 хв при плюс 37 °С				
Стоп - реагент	0,40	0,40	0,10	0,10
Сироватка крові	-	0,08	-	0,02
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)				

ПОБУДУВАННЯ КАЛІБРУВАЛЬНОГО ГРАФІКУ**Таблиця 3 - Калібрувальний графік для 1 години інкубації**

Відміряти у пробірку, мл	Калібрувальні крапки					Контрольн а 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.

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

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

УВАГА! МЕТОДИКА ВІЗНАЧЕННЯ МОДИФІКОВАНА! Змінено ПОРЯДОК ДОДАВАННЯ реагентів!!!

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.

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).

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.

ІНТЕРФЕРЕНЦІЯ

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

На хід визначення можуть впливати 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.
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.
2. Tietz NW, Clinical guide to laboratory tests, 2nd ed. Saunders Co, 1991.
3. Friedman and Young, Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Press.1997.
4. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997).



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: felicit@ukr.net <http://www.felicit.com.ua>