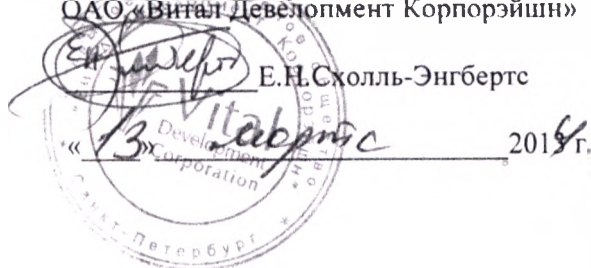


КОПИЯ ВЕРНА
ГЕН. ДИРЕКТОР
Е.Н.СХОЛЛЬ-ЭНГБЕРТС



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн»



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения активности
аланинаминотрансферазы (АЛТ) в сыворотке и плазме крови
унифицированным методом Райтмана-Френкеля.

(АЛТ– ВИТАЛ)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор АЛТ-ВИТАЛ предназначен для количественного определения активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) в сыворотке и плазме крови человека унифицированным динитрофенилгидразиновым методом Райтмана-Френкеля в клиничко-диагностических и биохимических лабораториях и в научно-исследовательской практике.

Набор рассчитан на проведение 400 или 800 определений при расходе 0,25 мл реагента 1 и 0,25 мл реагента 2 на один анализ.

ПРИНЦИП МЕТОДА

В результате реакции переаминирования между D, L- α -аланином и α -кетоглутаратом, происходящей под каталитическим действием аланинамино-трансферазы, образуются L-глутамат и пироват. Определение активности АЛТ основано на измерении оптической плотности окрашенных в щелочной среде 2,4-динитрофенилгидразонов α -кетоглутаровой и пировиноградной кислот, причем гидразон последней обладает гораздо более высокой оптической плотностью. Концентрация образовавшегося гидразона пировиноградной кислоты пропорциональна активности АЛТ в анализируемой пробе и измеряется фотометрически при длине волны 537 (500-560 нм).

СОСТАВ НАБОРА

В состав набора входят:

- реагент 1: субстратная смесь, состоящая из D,L- α -аланина, 200 ммоль/л; α -кетоглутаровой кислоты, 2,0 ммоль/л; фосфатного буферного раствора, 100 ммоль/л, pH 7,4; готов к применению – 1 флакон (100 мл или 250 мл);
- реагент 2: раствор 2,4-динитрофенилгидразина, содержащий 2,4-динитрофенилгидразин, 1,0 ммоль/л; соляную кислоту, 1,0 моль/л; готов к применению – 1 флакон (100 мл или 250 мл);
- реагент 3: гидроокись натрия, концентрат, 4,0 моль/л – 1 флакон (100 мл или 250 мл);
- калибратор (калибровочный раствор пировата натрия, 1,0 ммоль/л), готов к применению – 1 флакон (5,0 мл).

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейная область определения активности АЛТ – в диапазоне от 4,0 до 65 Е/л, отклонение от «линейности» – не более 10 %.

Чувствительность определения – не более 3,0 Е/л.

Коэффициент вариации результатов определений – не более 10 %.

Окраска стабильна в течение 30 мин.

Качество набора может проверяться по отечественным или зарубежным контрольным сывороткам, аттестованным данным методом.

Нормальные величины активности АЛТ в сыворотке (плазме) крови человека - не более 12 Е/л.

Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить диапазон значений нормальных величин для обследуемого контингента.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Свежая негемолизированная сыворотка (плазма) крови.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Реагент 2 содержит 2,4-динитрофенилгидразин, реагент 3 - щелочь. При работе с ними следует соблюдать осторожность и не допускать попадания этих реагентов на кожу и слизистые; при попадании следует промыть пораженное место большим количеством проточной воды. В случае попадания внутрь следует выпить 0,5 л теплой воды и вызвать рвоту.

Меры предосторожности - соблюдение «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

Согласно классификации по СанПиН 2.1.7.2790-10 компоненты набора могут быть отнесены к классу «Г». Утилизацию использованных реагентов и реагентов с истекшим сроком годности производить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 в отношении отходов класса «Г».

Не допускается использование серии набора по истечении срок ее годности.

ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАГЕНТЫ:

- Спектрофотометр, длина волны 537 нм, или фотоэлектроколориметр, длина волны 500-560 нм, кювета с длиной оптического пути 10 мм;
- термостат, обеспечивающий температуру $+37 \pm 1^\circ\text{C}$;
- пробирки вместимостью 5,0-10 мл;
- секундомер;
- пипетки, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,01; 0,1; 0,25; 2,5 и 5,0 мл;
- колба мерная вместимостью 1000 мл;
- вода бидистиллированная, свободная от карбонатов;
- физиологический раствор (0,9 % NaCl);
- перчатки резиновые или пластиковые.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Приготовление рабочего раствора реагента 3

Содержимое флакона с реагентом 3 (100 мл) количественно перенести в мерную колбу вместимостью 1000 мл, довести объем бидистиллированной водой, свободной от карбонатов, до метки и тщательно перемешать.

Рабочий раствор реагента 3 можно хранить во флаконе из полиэтилена с плотно закрывающейся крышкой при комнатной температуре (+18-25°C) не более 3 мес.

Построение калибровочного графика

В семь пробирок вместимостью 10 мл внести калибратор, реагент 1 и физиологический раствор в количествах, указанных в таблице.

Таблица

№ пробирок	Калибратор, мл	Физиологический раствор, мл	Реагент 1, мл	Активность АЛТ, Е/л
1	0,01	0,340	0,250	3,6
2	0,025	0,325	0,250	9,0
3	0,05	0,300	0,250	18
4	0,10	0,250	0,250	37
5	0,15	0,200	0,250	56
6	0,20	0,150	0,250	77
Контроль	-	0,350	0,250	-

Тщательно перемешать содержимое пробирок, добавить в каждую пробирку по 0,5 мл реагента 2, перемешать, выдержать при комнатной температуре в течение 20 мин, добавить по 5,0 мл рабочего раствора реагента 3, оставить на 10 мин при комнатной температуре для развития окраски и измерить оптическую плотность проб при длине волны 537 (500-560) нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм против контроля - физиологического раствора.

Определить разность (ΔE) между значениями оптических плотностей проб с 1-й по 6-ю и значением оптической плотности контрольной (холостой) пробы.

Построить калибровочный график, откладывая на оси ординат значения ΔE для каждой пробы, а на оси абсцисс – соответствующие им значения активности АЛТ.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Подготовить по одной пробирке вместимостью 10 мл для каждой анализируемой пробы сыворотки (плазмы) крови, а также по одной пробирке для контрольной (холостой) пробы по каждой анализируемой пробе крови.

Во все пробирки внести по 0,25 мл реагента 1 и инкубировать при температуре +37°C в течение 5 мин. В пробирки для опытных проб добавить по 0,05 мл анализируемых образцов сыворотки (плазмы) крови, тщательно перемешать и инкубировать при температуре +37°C в течение 30 мин. После окончания инкубации во все пробирки добавить по 0,25 мл реагента 2, а в каждую пробирку для контрольной (холостой) пробы добавить также по 0,05 мл соответствующего анализируемого образца сыворотки (плазмы) крови. Пробы тщательно перемешать и выдержать при комнатной температуре (+18-25°C) в течение 20 мин. После окончания инкубации добавить во все пробирки по 2,5 мл рабочего раствора реагента 3, пробы тщательно перемешать и выдержать при комнатной температуре в течение 10 мин. Измерить оптическую плотность опытных проб против контрольных (холостых) проб при длине волны 537 (500-560) нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм.

Активность АЛТ в анализируемых пробах сыворотки (плазмы) крови определить по калибровочному графику.

Для пересчета единиц активности АЛТ (Е/л) в ммоль/(л×ч) или в мккат/л необходимо найденное по калибровочному графику значение активности АЛТ разделить на коэффициент 16,67 или 60,68, соответственно.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор должен храниться в темном месте при комнатной температуре в упаковке предприятия-изготовителя в течение всего срока годности.

Срок годности набора – 18 мес.

Реагент 2 и реагент 3 после вскрытия флаконов можно хранить в темном месте при комнатной температуре в течение всего срока годности набора.

Калибратор и реагент 1 после вскрытия флаконов можно хранить в темном месте при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в плотно закрытом флаконе не более 6 мес.

Рабочий раствор реагента 3 можно хранить при комнатной температуре не более 3 мес.

Если активность АЛТ в сыворотке (плазме) крови превышает 65 Е/л, анализируемую пробу следует развести физиологическим раствором в 2 раза, повторить анализ и полученный результат умножить на 2.

Для отбора и добавления анализируемых проб и компонентов набора рекомендуется использовать полуавтоматические пипетки со сменяемыми наконечниками, аттестованные на точность по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн» по адресу:

194 156, Санкт-Петербург, пр. Энгельса, д.27, корп. 38, лит К, пом. 18, 19.

Тел/факс: (812) 326-61-98.

на кафедру КЛД ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России:

125 284, Москва, 2 Боткинский проезд, д. 5.

Тел.: (495) 945-82-22.

Генеральный директор

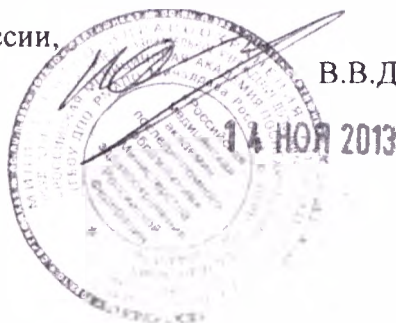
ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн»

Е.Н. Схолль-Энгбертс

Зав. кафедрой клинической лабораторной

диагностики ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России,

д.м.н., профессор



В.В.Долгов

Всего

листа(ов)

Ген. директор

Схолль-Энгберге Е.Е

