«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
Акционерного общества
«ДИАКОН-ДС»

_____ Смирнов А.В.

«20» декабря 2016 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для определения активности аланинаминотрансферазы динитрофенилгидразиновым методом по конечной точке в сыворотке крови (АЛТ КТ ДДС)

РУ № ФСР 2011/10443

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для количественного определения активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) в сыворотке крови по конечной точке в клинико-диагностических и биохимических лабораториях и научно-исследовательской практике.

Набор реагентов (АЛТ КТ ДДС) должен использоваться квалифицированным персоналом в области клинической лабораторной диагностики.

Количество определений зависит от объема фасовки и используемого биохимического анализатора.

МЕТОД

Метод Райтмана-Френкеля по конечной точке.

ПРИНЦИП МЕТОДА

В основе определения активности АЛТ с динитрофенилгидразином лежит метод Райтмана-Френкеля. Аланинаминотрансфераза в присутствии α-кетоглутарата катализирует реакцию переаминирования L-аланина с образованием пирувата.

$$\text{α-кетоглутарат} + \text{L-аланин} \xrightarrow{\text{АЛТ}} \text{L-глутамат} + \text{пируват}$$

Пируват с 2,4-динитрофенилгидразином в щелочной среде образует окрашенный гидразон, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна активности АЛТ и измеряется фотометрически при длине волны 505 (500-560) нм.

СОСТАВ НАБОРА

Реагент 1: буферно-субстратный раствор, pH 7,4, содержащий L-аланин, ≥100 ммоль/л; α-кетоглутаровая кислота, 2,0 ммоль/л; азид натрия, 0,095% – 1 флакон (100 мл), 2 флакона (по 100 мл), 2 флакона (по 90 мл) или 1 флакон (1000 мл).

Реагент 2: раствор, содержащий 2,4-динитрофенилгидразин, 0,9 ммоль/л, соляную кислоту, 1,0 моль/л – 1 флакон (100 мл), 2 флакона (по 100 мл), 2 флакона (по 90 мл) или 1 флакон (1000 мл).

Реагент 3: концентрированный раствор гидроокиси натрия, 4,0 моль/л – 1 флакон (100 мл), 2 флакона (по 100 мл), 2 флакона (по 90 мл) или 1 флакон (1000 мл).

Калибратор: калибровочный раствор пирувата натрия, 1,0 ммоль/л; азид натрия, 0,095% –1 флакон (3,0 мл), 2 флакона (по 3,0 мл), 10 флаконов (по 3,0 мл), 3 флакона (по 10 мл).

ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Линейность в диапазоне от 4,0 до 70 Е/л.
- Отклонение от линейности не превышает 7%.
- Чувствительность – не более 3,0 Е/л
- Коэффициент вариации – не более 7%.

При активности аланинаминотрансферазы в сыворотке крови выше 70 Е/л анализируемую пробу следует развести физиологическим раствором (0,9% NaCl) в 4 раза, повторить анализ и полученный результат умножить на 4.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для внутреннего контроля качества с каждой серией образцов проводите измерения контрольных сывороток, аттестованных данным методом.

Калибровку рекомендуется проводить в следующих случаях: при нестабильности результатов контроля качества, в случае выхода значений контроля качества за пределы установленных диапазонов для используемого лота контрольного материала, при использовании нового набора.

НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

В сыворотке крови (В.С. Камышников, 2014):

Дети:		Взрослые:	
До 1 мес.	до 32 Е/л	Мужчины	до 22 Е/л
1 – 12 мес.	до 36 Е/л	Женщины	до 17 Е/л
1 – 16 лет	до 21 Е/л		

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

ОБРАЗЦЫ

Негемолизированная сыворотка крови человека. Сыворотку крови следует отделить от форменных элементов крови не позднее, чем через 1 час после забора крови.

Стабильность:

3 дня	при 15–25°С
7 дней	при 2–8°С
7 дней	при -20°С

Загрязненные образцы хранению не подлежат.
Замораживать образцы можно не более одного раза!

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2а (Приказ Минздрава РФ от 06.06.2012 № 4н).

В Реагенте 1 и калибраторе содержится токсичный компонент – азид натрия, реагент 2 содержит соляную кислоту, реагент 3 – гидроокись натрия. При работе с ними следует соблюдать осторожность и не допускать попадания на кожу и слизистые; при попадании немедленно промыть пораженное место

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

...шим количеством проточной воды. При проглатывании следует выпить 0,5 л теплой воды и вы...вать 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» (Москва, 1981 г.).

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

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Реагенты 1, 2 и Калибратор готовы к использованию.

Приготовление щелочного раствора.

В мерную колбу вместимостью 1000 мл внести 100 мл реагента 3, довести объем до метки дистиллированной водой и перемешать.

Щелочной раствор можно хранить при температуре 2-25°С в течение всего срока годности набора при условии достаточной герметичности флакона.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Компоненты реакционной смеси отбирать в количествах, указанных в таблице 1.

Таблица 1

Отмерить, мл	*Контрольная (холостая) проба*	*Контрольная проба на сыворотку*	*Опытная проба*
Реагент 1	0,25	0,25	0,25
Инкубировать при температуре 37°С в течение 5 минут, добавить			
Сыворотка крови	–	–	0,05
Вода дистиллированная	0,05	–	–
Перемешать и инкубировать при температуре 37°С точно 30 минут, добавить			
Реагент 2	0,25	0,25	0,25
Сыворотка крови	–	0,05	–
Перемешать и выдержать при комнатной температуре (15-25°С) в течение 20 минут, добавить			
Щелочной раствор	2,5	2,5	2,5

Пробы тщательно перемешать и выдержать при комнатной температуре в течение 5 минут. Измерить оптические плотности опытной пробы (A_1) и контрольной пробы на сыворотку (A_2) против контрольной (холостой) пробы в кювете с длиной оптического пути 10 мм при длине волны 505 (500-560) нм. Окраска растворов стабильна в течение 30 минут.

Для определения активности АЛТ использовать разность оптических плотностей (А) опытной пробы и контрольной пробы на сыворотку: $A = A_1 - A_2$.

Примечание. Количество реагентов и анализируемых образцов в зависимости от объема используемой кюветы может быть пропорционально изменено (соотношение реагент 1: реагент 2: сыворотка крови: щелочной раствор составляет 5:1:5:50).

РАСЧЕТЫ

Расчет активности аспартатаминотрансферазы в сыворотке крови произвести по калибровочному графику. Компоненты реакционной смеси для построения калибровочного графика

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ить в количествах, указанных в таблице 2.

ПОСТРОЕНИЕ КАЛИБРОВОЧНОГО ГРАФИКА

Таблица 2

№№ пробирок	Калибратор	Дистиллированная вода	Реагент 1	Реагент 2	Активность АЛТ	
	мл				Е/л	мккат/л
1	–	0,1	0,50	0,5	–	–
2	0,05	0,1	0,45	0,5	17	0,28
3	0,10	0,1	0,40	0,5	34	0,56
4	0,15	0,1	0,35	0,5	50	0,83
5	0,20	0,1	0,30	0,5	67	1,11
6	0,25	0,1	0,25	0,5	83	1,39

После добавления Реагента 2 пробы тщательно перемешать, выдержать при комнатной температуре (15-25°С) в течение 20 минут, затем во все пробирки добавить по 5,0 мл щелочного раствора, тщательно перемешать, выдержать при комнатной температуре в течение 5 минут. Измерить оптическую плотность растворов в пробирках №№ 2-6 против раствора в пробирке № 1 в кювете с длиной оптического пути 10 мм при длине волны 505 (500-560) нм. Окраска растворов стабильна в течение 30 минут.

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

СПЕЦИФИЧНОСТЬ/ПОМЕХОУСТОЙЧИВОСТЬ

Аскорбиновая кислота до 30 мг/дл, билирубин до 40 мг/дл, гемоглобин до 400 мг/дл и липемия до 2000 мг/дл триглицеридов не влияют на точность анализа. Дополнительных веществ (АЛФ), устраняющих липемичность сыворотки, не требуется

ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Транспортирование и хранение наборов должно производиться в темном месте при температуре 2–8°С в упаковке предприятия-изготовителя в течение всего срока годности. Допускается транспортирование и хранение наборов при температуре до 25°С не долее 5 суток. Замораживание компонентов набора не допускается.

Срок годности набора – 12 месяцев.

При соблюдении условий хранения все компоненты набора стабильны в течении всего срока годности.

Реагенты 1, 2 и 3 после вскрытия флаконов могут храниться при температуре 2–8°С в темном месте в течение всего срока годности наборов при условии достаточной герметичности флаконов.

Щелочной раствор можно хранить при температуре 2-25°С в течение всего срока годности набора при условии достаточной герметичности флакона.

Калибратор после вскрытия флакона можно хранить при температуре 2–8°С в течение 3 месяцев при условии достаточной герметичности флакона.

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

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

АО «ДИАКОН-ДС» гарантирует качество, эффективность и безопасность медицинского изделия, отсутствие недопустимого риска причинения вреда жизни, здоровью человека и окружающей среде при использовании набора реагентов по назначению в условиях, предусмотренных данной инструкцией по применению.

Гарантийные обязательства АО «ДИАКОН-ДС» распространяются с даты изготовления и на период срока годности медицинского изделия, при условии надлежащего транспортирования, хранения и эксплуатации.

УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ

Набор реагентов **АЛТ КТ ДДС** предназначен для применения в клинико-диагностических и биохимических лабораториях и научно-исследовательской практике. При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

Утилизацию, уничтожение и дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

По вопросам, касающимся качества набора **АЛТ КТ ДДС**, следует обращаться в АО «ДИАКОН-ДС» по адресу:142290, г. Пущино, Московской обл., ул. Грузовая 1а;
тел. (495) 980-63-38; т/факс (495) 980-66-79.

Начальник Отдела Исследований и Разработок
АО «ДИАКОН-ДС» к. б. н. О. Ю. Гудкова

«СОГЛАСОВАНО»
Генеральный директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»_____ П. К. Варнавичус

«29» 00 2016 г

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU

ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 5 ЛИСТОВ
«29» 10 2016 год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ – МЕДЦЕНТР»

П.К. Вайнавичус _____

ООО ЦИРМИ INFO@CIRMI.RU WWW.GOSZDRAVNADZOR.RU