

Копия верна



УТВЕРЖДАЮ
Начальник Управления
Государственного контроля
лекарственных средств
и медицинской техники



Р.У. Хабриев
1998 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для
определения активности аспартатаминотрансферазы
в сыворотке и плазме крови ^{ИИПТ} дифенилгидразиновым методом

(ТРАНСАМИНАЗА-АСТ-НОВО)

Рекомендована к утверждению экспертной
комиссией по лабораторным реагентам
Комитета по новой медицинской технике МЗ РФ
(Протокол № 9 от 22 декабря 1997 г.)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор ТРАНСАМИНАЗА-АСТ-НОВО предназначен для определения активности аспартатаминотрансферазы (АСТ) в сыворотке или плазме крови человека унифицированным методом Райтмана-Френкеля в клинико-диагностических и биохимических лабораториях и научно-исследовательской практике.

Набор рассчитан на проведение 400 определений при расходе 0,25 мл Реагента I на 1 анализ.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Определение активности АСТ основано на измерении оптической плотности при длине волны 490 (490-540) нм окрашенного в щелочной среде 2,4-динитрофенилгидразона пировиноградной кислоты. Концентрация образовавшегося гидроазона пировиноградной кислоты пропорциональна активности АСТ.

СОСТАВ НАБОРА

В состав набора входят:

Реагент 1 - субстрат АСТ (L-аспарагиновая кислота - 0,1 моль/л, α -кетоглутаровая кислота - 2 ммоль/л в 0,1 моль/л фосфатном буфере, pH 7,4, азид натрия 0,03 %), готовый к использованию, 4 флакона (по 25 мл).

Реагент 2 - 2,4-динитрофенилгидразин (1 ммоль/л в 1 моль/л соляной кислоте), готовый к использованию, 1 флакон (100 мл).

Реагент 3 - гидроокись натрия (4 моль/л), 1 флакон (100 мл).

Конечная концентрация Реагента 3 в рабочем растворе - 0,4 моль/л.

Калибратор – натрий пировинограднокислый (1,5 ммоль/л в 0,1 моль/л фосфатном буфере, pH 7,4), готовый к использованию, 1 флакон (5 мл).

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Набор обеспечивает линейность при определении активности АСТ в диапазоне 10-70 Е/л, отклонение от линейности - не более 10 %.

Чувствительность определения - не более 7 Е/л.

Коэффициент вариации результатов измерений - не более 10 %.

Окраска раствора стабильна в течение 30 мин.

Качество набора можно оценивать по отечественным или зарубежным контрольным сывороткам, аттестованным динитрофенилгидразиновым методом.

Нормальные величины активности АСТ в сыворотке крови у взрослых людей - до 7,5 Е/л $[(0,45 \text{ ммоль/л} \times \text{ч})]$.

Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить диапазон значений нормальных величин у исследуемого контингента людей.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Реагент 3 содержит гидроокись натрия. При попадании его на кожу тотчас смыть большим количеством воды.

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

ОБРАЗЦЫ

Негемолизированная сыворотка или плазма крови.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ:

- Спектрофотометр (длина волны 490 нм) или фотозлектроколориметр (интервал длин волн 490 - 540 нм), кювета с длиной оптического пути 1 см;
- Термостат водяной, поддерживающий температуру $+37 \pm 1$ °C;
- Пипетки-дозаторы, позволяющие отбирать объемы жидкости от 25 до 5000 мкл;
- Колба мерная вместимостью 1000 мл;
- Пробирки стеклянные вместимостью 10-15 мл;
- Перчатки резиновые или пластиковые;
- Физиологический раствор (0,9% NaCl);
- Вода дистиллированная.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РАСТВОРА РЕАГЕНТА 3

Содержимое флакона с **Реагентом 3** количественно перенести в мерную колбу вместимостью 1000 мл. Объем колбы довести до метки дистиллированной водой (свежепрокипяченной и охлажденной) и перемешать.

Рабочий раствор **Реагента 3** можно хранить в полиэтиленовой банке с плотно закрытой крышкой при комнатной температуре ($+18$ - 25 °C) не более 6 месяцев. При появлении белого рыхлого осадка раствор не использовать.

ПОСТРОЕНИЕ КАЛИБРОВОЧНОГО ГРАФИКА

Таблица 1

№ пробирки	Калибратор, мл	Вода дистиллированная, мл	Реагент 1, мл	Активность АСТ		
				Е/л	ммоль/(л×ч)	мккат/л
1	2	3	4	5	6	7
0	—	0,10	0,50	—	—	—
1	0,025	0,10	0,475	6,25	0,37	0,103
2	0,05	0,10	0,45	12,50	0,75	0,209
3	0,10	0,10	0,40	25,0	1,50	0,417
4	0,15	0,10	0,30	50,0	3,00	0,834
5	0,30	0,10	0,20	75,0	4,25	1,182

В пробирки внести Калибратор, Реагент 1 и дистиллированную воду в соответствии с таблицей 1. Раствор тщательно перемешать и добавить 0,5 мл Реагента 2, перемешать и выдержать при комнатной температуре (+18-25 °С) в течение 20 мин, после чего добавить 5,0 мл рабочего раствора Реагента 3, оставить на 10 мин при комнатной температуре для развития окраски. Измерить оптическую плотность проб против дистиллированной воды при длине волны 490 (490-540) нм.

Калибровочный график построить, откладывая по оси ординат разность оптических плотностей опытных и контрольной (холостой) пробы (пробирка 0), а по оси абсцисс – соответствующие им значения активности АСТ, используя данные графы 5 таблицы 1.

Правильность определения активности АСТ зависит от тщательности построения калибровочного графика.

Для перевода единиц активности АСТ Е/л в ммоль/(л×ч) и мккат/л необходимо найденное по калибровочному графику значение активности разделить на коэффициенты 16,67 и 60,68, соответственно.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Компоненты реакционной смеси для определения активности АСТ внести в пробирки в количествах, указанных в таблице 2. При использовании для измере-

ния оптической плотности кюветы объемом 5 мл, увеличить объёмы вносимых компонентов в 2 раза.

Таблица 2

Отмерить (мл)	Опытная проба		Контрольная (холостая) проба	
			Конечный объём	
	3,05	1,22	3,05	1,22
Реагент 1	0,25	0,10	0,25	0,10
Выдержать при температуре + 37 °С в течение 5 мин				
Сыворотка или плазма крови	0,05	0,02	—	—
Дистиллированная вода	—	—	0,05	0,02
Перемешать и выдержать точно 60 мин при температуре + 37 °С				
Реагент 2	0,25	0,10	0,25	0,10
Перемешать и выдержать в течение 20 мин при комнатной температуре (+18-25 °С)				
Реагент 3 (рабочий раствор реагента)	2,50	1,00	2,50	1,00
Тщательно перемешать, выдержать в течение 10 мин при комнатной температуре (+18-25 °С)				

Измерить оптическую плотность растворов опытной и контрольной (холостой) проб против дистиллированной воды пробы на спектрофотометре или фотоэлектроколориметре при длине волны 490 (490-540) нм в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 1 см. Окраска растворов устойчива в течение 30 мин.

Расчёт активности АСТ провести по калибровочному графику. Для этого на оси ординат отметить разницу оптических плотностей опытных и контрольной пробы, а на оси абсцисс найти соответствующие им значения активностей.

В случае, если активность АСТ превышает 75 Е/л, сыворотку или плазму крови необходимо разбавить физиологическим раствором, процедуру анализа повторить и учесть разбавление при расчёте.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до + 25°С не более 10 сут.

Срок годности набора — 12 месяцев.

Реагент 1 после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытом виде при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 6 мес. Допускается замораживание Реагента 1, повторное замораживание не рекомендуется.

Реагент 2 после вскрытия флакона можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 6 мес.

Рабочий раствор реагента 3 можно хранить при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) не более 6 мес. (если не появляется белый рыхлый осадок).

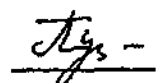
Калибратор после вскрытия флакона можно хранить плотно закрытым при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ не более 6 мес.

По вопросам, касающимся качества наборов, следует обращаться по адресу: 633159, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, ЗАО «Вектор-Бест», тел. (3832) 39-62-23, 32-67-52, 32-67-49.

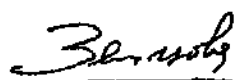
Зав. лабораторией
ЗАО «Вектор-Бест», к.х.н.

 В.К. Старостина

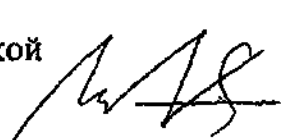
Зав. лабораторией
ЗАО «Вектор-Бест», к.х.н.

 В.И. Пупкова

Старший научный сотрудник
ЗАО «Вектор-Бест»

 Л.В. Земцова

Зав. КДЛ Областной клинической
больницы г. Новосибирска

 А.Н. Цибин