

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 20__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

_____ 2012 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения активности
аланинаминотрансферазы в сыворотке и плазме крови
динитрофенилгидразиновым методом
(ТРАНСАМИНАЗА-АЛТ-НОВО)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

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

1.2. Набор рассчитан на проведение 400 определений при расходе 0,25 мл реагента 1 на одно определение.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

В результате реакции переаминирования, происходящей под действием аланинаминотрансферазы, образуется глутаминовая и щавелевоуксусная кислоты (последняя спонтанно превращается в пировиноградную). Определение активности основано на измерении оптической плотности при длине волны 490 (490-540) нм окрашенных в щелочной среде 2,4-динитрофенилгидразонов глутаминовой и пировиноградных кислот, причем гидразон последней обладает гораздо более высокой оптической плотностью. Концентрация образовавшегося гидразона пировиноградной кислоты пропорциональна активности АЛТ.

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: нач. отдела, к.б.н. Л.В. Гаевой, нач. участка Е.А. Курбатовой.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

– реагент 1 – субстрат АЛТ (L-аланиновая кислота, 0,1 моль/л; α -кетоглутаровая кислота, 2 ммоль/л в 0,1 моль/л фосфатном буфере; pH 7,4 $\pm$ 0,1; 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);

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

Конечная концентрация реагента 3 в рабочем растворе – 0,4 моль/л.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Линейность. Линейная область определения активности аланинаминотрансферазы – в диапазоне от 10 до 70 Е/л. Отклонение от «линейности» – не более 10%.

3.2. Чувствительность определения – не более 7 Е/л.

3.3. Коэффициент вариации результатов измерений – не более 10%.

3.4. Нормальные величины активности АЛТ в сыворотке крови у мужчин и женщин в возрасте от 20 до 50 лет – не более 11,3 Е/л [(0,68 ммоль/(л $\times$ ч)].

3.5. Рекомендуются в каждой лаборатории при использовании набора уточнить диапазон нормальных величин активности АЛТ для обследуемого контингента людей.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1 (ГОСТ Р 51609-2000).

4.2. Реагент 3 содержит гидроокись натрия при работе с ним и его рабочим раствором не следует допускать их попадания на кожу; при попадании на кожу следует промыть поражённое место проточной водой.

4.3. При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 февраля 1991 г. и методических указаниях МУ-287-113-00.

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки, плазмы крови человека следует рассматривать как по-

тенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- Спектрофотометр (длина волны 490 нм) или фотоэлектроколориметр (интервал длин волн 490 – 540 нм), кювета с длиной оптического пути 1 см;
- термостат водяной, поддерживающий температуру $+37 \pm 0,5$ °С;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы 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.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Негемолизированная сыворотка или плазма крови.

Сыворотки можно хранить при температуре $+2-8$ °С не более 3 сут; активность АЛТ снижается после 3-х дней хранения при температуре $+2-8$ °С на 10%.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Приготовление рабочего раствора реагента 3

Содержимое флакона с реагентом 3 количественно перенести в мерную колбу вместимостью 1000 мл. Объём колбы довести до метки дистиллированной водой и перемешать.

Рабочий раствор реагента 3 можно хранить в плотно закрытом виде при комнатной температуре ($+18-25$ °С) не более 6 месяцев. При появлении белого рыхлого осадка раствор не использовать!

7.2. Построение калибровочного графика

7.2.1. 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 в течение 20 мин, после чего добавить 5,0 мл рабочего раствора реагента 3, оставить на 10 мин при комнатной температуре для развития окраски.

7.2.2. Измерить оптическую плотность проб против дистиллированной воды при длине волны 490 (490-540) нм.

Таблица 1

№ пробирки	Калибратор, мл	Вода дистиллированная, мл	Реагент 1, мл	Активность АЛТ		
				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

7.2.3. 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 АЛТ, используя данные графы 5 таблицы 1.

Правильность определения активности АЛТ зависит от тщательности построения калибровочного графика.

Примечание. Для перевода единиц активности АЛТ 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.

7.3. Компоненты реакционной смеси для определения активности АЛТ внести в пробирки в количествах, указанных в таблице 2.

Таблица 2

Отмерить (мл)	Опытная проба		Контрольная (холостая) проба	
	Конечный объем		Конечный объем	
	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				

При использовании кюветы объёмом 5 мл для измерения оптической плотности, увеличить объёмы вносимых компонентов в 2 раза.

7.3.1. 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.

8. РАСЧЁТЫ

8.1 Расчёт активности АЛТ 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 АЛТ превышает 75 Е/л, сыворотку или плазму крови необходимо разбавить физиологическим раствором, процедуру анализа повторить и учесть разбавление при расчёте.

9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

9.1. Набор реагентов ТРАНСАМИНАЗА-АЛТ-НОВО должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности (24 мес). Допускается хранение набора при температуре до +25 °С не более 10 сут. Замораживание компонентов набора не допускается.

9.2. Реагент 1 после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытом виде при температуре +2-8 °С не более 6 мес. Допускается замораживание реагента 1, повторное замораживание не рекомендуется.

9.3. Реагент 2 после вскрытия флакона можно хранить при температуре +2-8 °С не более 6 мес.

9.4. Рабочий раствор реагента 3 можно хранить в плотно закрытом виде при комнатной температуре (+18-25 °С) не более 6 мес (если не появляется белый рыхлый осадок).

9.5. Калибратор после вскрытия флакона можно хранить плотно закрытым при температуре +2-8 °С не более 6 мес.

9.6. Для проведения анализа использовать свежую сыворотку крови без следов гемолиза.

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

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

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

По вопросам, касающимся качества набора ТРАНСАМИНАЗА-АЛТ-НОВО, следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 227-67-64, 227-75-50, тел./факс (383) 363-13-46.

Начальник участка

ЗАО «Вектор-Бест»

Е.А. Курбатова

/ Начальник отдела биохимии

ЗАО «Вектор-Бест», к.б.н.

Л.В. Гаевая

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической

лабораторной диагностики

ГБОУ ДПО РМАПО

Минздравсоцразвития России



д.м.н., профессор В.В. Долгов
«20» 04 2012 г.

Подпись
удостоверяю:
Специалист по кадрам РМАПО
Подпись _____
" ____ 20 ____ года



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
шесть листов