

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 2011 г. № _____

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ОАО «Витал-Девелопмент Корпорэйшн»

Е.Н.Схолль-Энгбертс

2011 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения
активности аспартатаминотрансферазы в сыворотке (плазме) крови
оптимизированным кинетическим энзиматическим методом

(АСТ-Витал)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор АСТ-Витал предназначен для количественного определения активности аспартатаминотрансферазы в сыворотке (плазме) крови оптимизированным кинетическим энзиматическим методом в клиничко-диагностических и биохимических лабораториях и научно-исследовательской практике.

Набор выпускается в двух видах – лиофилизированном (вариант 1) и жидком (вариант 2) и рассчитан на проведение 100 или 200 определений при расходе 0,5 мл рабочего реагента на один анализ.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Кинетическое спектрофотометрическое определение активности аспартатаминотрансферазы основано на регистрации уменьшения оптической плотности анализируемого образца при длине волны 340 нм в результате проведения следующих реакций:

АСТ

$L\text{-аспартат} + \alpha\text{-кетоглутарат} \longrightarrow \text{оксалоацетат} + L\text{-глутамат}$

МДГ

$\text{Оксалоацетат} + \text{NADH} + \text{H}^+ \longrightarrow L\text{-малат} + \text{NAD}$

Образующийся в первой реакции оксалоацетат окисляет далее NADH в присутствии малатдегидрогеназы (МДГ), что сопровождается уменьшением оптической плотности при длине волны 340 нм, и это уменьшение пропорционально активности АСТ в пробе.

СОСТАВ НАБОРА

В состав набора входят:

А. Вариант 1.

- реагент 1: буфер, pH 7,5, включающий трис, 80 ммоль/л; L-аспартат, 240 ммоль/л; α -кетоглутарат, 12 ммоль/л; натрия азид, 0,03% - 1 флакон (50 мл) или 2 флакона (по 50 мл);
- реагент 2: лиофилизированная смесь (конечная концентрация в рабочем реагенте: ЛДГ, 660 Е/л; МДГ, 460 Е/л; NADH, 0,18 ммоль/л; натрия азид, 0,03%; бычий сывороточный альбумин, 1 г/л) - 1 или 2 флакона.

В. Вариант 2.

- реагент 1: L-аспартат, 240 ммоль/л; трис, 80 ммоль/л; ЛДГ, 660 Е/л; МДГ, 460 Е/л; натрия азид, 0,03% - 1 флакон (40 мл или 80 мл) или 2 флакона (по 40 мл);
- реагент 2: α -кетоглутарат, 12 ммоль/л; NADH, 0,18 ммоль/л; натрия азид, 0,03% - 1 флакон (10 мл или 20 мл) или 2 флакона (по 10 мл).

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Набор обеспечивает линейную область определения активности аспаратаминотрансферазы в диапазоне от 10 до 190 Е/л, отклонение от линейности не превышает 5 %.

Чувствительность – не более 7 Е/л.

Коэффициент вариации результатов определений – не более 5 %.

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

Нормальные величины активности АСТ в сыворотке или плазме крови у мужчин составляют от 10 до 40 Е/л, у женщин – от 10 до 31 Е/л.

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

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

Реагенты 1 и 2 содержат токсичный компонент – азид натрия в качестве протектора. Следует избегать попадания реагентов 1 и 2 на кожу и слизистые; при попадании немедленно промыть пораженное место проточной водой. При проглатывании 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 сывороткой или плазмой крови следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять или передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

ОБРАЗЦЫ

Свежая негемолизированная сыворотка или плазма крови.

Активность АСТ в сыворотке или плазме крови снижается после 3 дней хранения: при температуре +2-8°C – на 10 %, при комнатной температуре (+18-25°C) – на 17 %.

ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАГЕНТЫ:

- Спектрофотометр, длина волны 340 нм, термостатируемая кювета с длиной оптического пути 10 мм; полуавтоматический или автоматический биохимический анализатор открытого типа;
- термостат, поддерживающий температуру $+37 \pm 1^\circ\text{C}$;
- секундомер;
- пипетки, позволяющие отбирать объемы жидкости 50 и 500 мкл;
- колба коническая вместимостью 100 мл;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- физиологический раствор (0,9% NaCl).

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Приготовление рабочего реагента

Для варианта 1: Содержимое одного флакона с реагентом 2 растворить в одном флаконе с реагентом 1, тщательно перемешать и после полного растворения лиофилизата выдержать при комнатной температуре (+18-25°C) в течение 5-10 мин.

Полученный рабочий реагент можно хранить в темном месте при температуре +2-8°C не более 30 дней или при комнатной температуре не более 5 дней.

Для варианта 2: Смешать в колбе конической вместимостью 100 мл необходимое количество реагента 1 и реагента 2 в соотношении 4:1. Тщательно закрыть флаконы с реагентами 1 и 2 непосредственно после каждого использования.

Полученный рабочий реагент можно хранить при температуре +2-8°C не более 30 дней или при комнатной температуре не более 5 дней.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Перед началом работы кювету спектрофотометра и рабочий реагент нагреть до температуры +37°C в течение 5 мин. При измерении оптической плотности постоянно поддерживать температуру +37°C.

В кювету спектрофотометра внести 500 мкл рабочего реагента, добавить 50 мкл сыворотки или плазмы крови, перемешать, включить секундомер и точно через 1 мин измерить оптическую плотность пробы при длине волны 340 нм в кювете с длиной оптического 10 мм против воздуха. Замер оптической плотности повторить три раза с интервалом в 1 мин (точно!).

РАСЧЕТЫ

Определить изменение оптической плотности пробы за 1 мин ($\Delta E/\text{мин}$) по формуле (1):

$$\Delta E/\text{мин} = \Delta E_n/t \quad (1),$$

где: ΔE_n - изменение оптической плотности пробы, ед. опт. плотности.;
 t - интервал времени между определениями, мин.

Расчет активности АСТ провести по формуле (2):

$$A = \Delta \bar{E}/\text{мин} \times 1746 \quad (2),$$

где: A - активность АСТ, Е/л:

$\Delta \bar{E}/\text{мин}$ - изменение оптической плотности пробы в 1 мин:

1746 - фактор пересчета (указывается в паспорте на набор).

Примечание. 1 Е/л = 16,67 нмоль/(схл).

Набор позволяет провести определение активности АСТ в сыворотке или плазме крови также при температуре +25 °С или + 30°C. При этом ход проведения анализа остается таким же, как это изложено выше; при измерении оптической плотности пробы необходимо постоянно поддерживать температуру проведения определения (+ 25°C или + 30°C).

При необходимости выражения полученной активности АСТ в Е/л при различных температурных условиях следует использовать температурные коэффициенты пересчета, приведенные в таблице.

Таблица

Температура инкубации	+ 25 °С	+ 30 °С	+ 37°C
+ 25°C	1,00	1,37	2,08
+ 30 °С	0,73	1,00	1,54
+ 37 °С	0,48	0,65	1,00

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор должен храниться при температуре +2-8°C в упаковке предприятия-изготовителя в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°C не более 5 сут. Срок годности набора – 12 мес.

Реагенты 1 и 2 (по варианту 2) после вскрытия флаконов можно хранить при температуре +2-8°C не более 90 дней при условии достаточной герметичности флаконов.

Рабочий реагент, приготовленный из реагентов по варианту 2, можно хранить при температуре +2-8 °C не более 14 дней или при комнатной температуре (+18-25 °C) не более 5 дней.

Рабочий реагент, приготовленный из реагентов по варианту 1, можно хранить в темном месте при температуре +2-8°C не более 30 дней или при комнатной температуре не более 5 дней.

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

В том случае, когда величина $\Delta \bar{E}/\text{мин}$ превышает 0,11, образец сыворотки или плазмы крови следует развести физиологическим раствором в 10 раз, провести анализ и полученный результат умножить на 10.

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.

Тел/факс: (812) 326-61-98.

и на кафедру КЛД ГОУ ДПО «РМАПО Росздрава» по адресу:

116 000, Москва, 2-й Боткинский пр, д. 5.

Тел.: (495) 945-82-22.

Генеральный директор
ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн»

Е.Н. Схолль-Энгбертс

Зав. кафедрой клинической лабораторной
диагностики с курсом молекулярной медицины,
директор НЦ «Институт лабораторной медицины»
ГОУ ВПО СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова Росздрава,
Главный специалист-эксперт
по клин. лаб. диагностике Росздравнадзора
по С-ЗФО, д. м. н., профессор

В.Л.Эмануэль

