

КОПИЯ ВЕРНА

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения и
социального развития

Р.У.Хабриев

2006 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения активности
аланинаминотрансферазы в сыворотке крови унифицированным методом
(метод Райтмана-Френкеля)
(АЛТ-РФ-ОЛЬВЕКС)

Рекомендована к утверждению Научно-экспертным Советом
по медицинским изделиям

Назначение

Набор АЛТ-РФ-ОЛЬВЕКС предназначен для количественного определения активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) в сыворотке крови человека унифицированным методом с фиксированным временем инкубации в клиничко-диагностических и биохимических лабораториях и в научно-исследовательской практике.

Набор рассчитан на проведение 1000 определений при конечном объеме реакционной смеси 3,05 мл.

Инструкция составлена директором по науке ООО «Ольвекс Диагностикум», к.б.н. З.А.Тупиковой и заведующим кафедрой клинической лабораторной диагностики СПбМА-ПО, д.м.н., профессором А.В.Козловым.

Принцип метода

АЛТ катализирует реакцию переаминирования между L-аланином и α -кетоглутаровой кислотой с образованием пировиноградной кислоты. Об активности фермента судят по приросту пировиноградной кислоты, образующей с 2,4-динитрофенилгидразином окрашенные гидразоны.

Активность АЛТ пропорциональна количеству образовавшихся гидразонов, которое определяется фотометрически при длине волны 537 (500-560) нм.

Состав набора

В состав набора реагентов входят следующие компоненты:

- реагент 1 (буфер-субстратная смесь), содержащая L-аланин, 100 ммоль/л; альфа-кетоглутаровую кислоту, 2,0 ммоль/л; натрий фосфорнокислый однозамещенный, 19 ммоль/л; натрий фосфорнокислый двузамещенный, 81 ммоль/л; азид натрия, 0,5 г/л; натрия гидроокись до pH 7,4, готов к применению - 1 флакон (250 мл);
- реагент 2 (раствор 2,4-ДНФГ), содержащий 2,4-динитрофенилгидразин, 1,0 ммоль/л; соляную кислоту, 1,0 моль/л, готов к применению – 1 флакон (250 мл);
- реагент 3 (натрия гидроокись) концентрат, содержащий гидроокись натрия, 4,0 моль/л - 1 флакон (250 мл);
- калибратор, содержащий пируват натрия, 1,0 ммоль/л; азид натрия, 0,5 г/л; готов к применению – 1 флакон (5,0 мл).

Аналитические характеристики

Линейная область определения активности АЛТ - в диапазоне от 0,03 до 1,67 мкмоль/(с×л), отклонение от линейности - не более 10%.

Чувствительность определения - не более 0,01 мкмоль/(с×л).

Коэффициент вариации результатов определений - не более 10%.

Окраска стабильна не более 2 часов.

Качество набора может проверяться при помощи отечественных или зарубежных контрольных сывороток, аттестованных данным методом.

Нормальные величины активности АЛТ в сыворотке крови составляют от 0,03 до 0,19 мкмоль/(с×л) или 0,1-0,68 ммоль/(ч×л).

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

Анализируемые образцы

Сыворотка крови без следов гемолиза.

Меры предосторожности

Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

В состав компонентов набора входят азид натрия, соляная кислота и натрия гидроксид. Следует избегать их попадания на кожу и слизистые; при попадании немедленно промыть пораженное место большим количеством проточной воды. При попадании внутрь следует немедленно выпить 0,5 л теплой воды и вызвать рвоту.

При работе с набором необходимо соблюдать "Правила 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 использовать 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 инфекции.

Оборудование, материалы и реагенты:

- Спектрофотометр, длина волны 537 нм, или фотоэлектроколориметр, длина волны 500-560 нм, кювета с длиной оптического пути 1,0 см;
- термостат, поддерживающий температуру $+37 \pm 1^\circ\text{C}$;
- колбы вместимостью 100 мл;
- секундомер;
- пипетки, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,004-0,6 мл; 2,5 мл и 5,0 мл;
- пробирки стеклянные химические вместимостью 5,0-10 мл;

- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

Подготовка к анализу

Реагенты 1, 2 и калибратор готовы к применению.

Перед определением содержимое флакона 3 (или аликвоту) разводят дистиллированной водой, свободной от карбонатов, в соотношении 1:9.

Полученный рабочий раствор реагента 3 можно хранить при комнатной температуре (+18-25°C) в плотно закрытом полиэтиленовом флаконе не более 3 месяцев.

Построение калибровочного графика

Подготовить пробы в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1

№ пробы	Калибратор, мл	Вода дистиллированная, мл	Реагент 2, мл	Ферментативная активность	
				мкмоль/(с×л)	ммоль/(ч×л)
1	0,004	0,596	0,500	0,022	0,08
2	0,020	0,580	0,500	0,112	0,40
3	0,050	0,550	0,500	0,278	1,00
4	0,100	0,500	0,500	0,556	2,00
5	0,200	0,400	0,500	1,112	4,00
6	0,300	0,300	0,500	1,668	6,00
контроль	-	0,600	0,500	-	-

Пробы тщательно перемешать и выдержать в течение 20 минут при комнатной температуре (+18-25°C), после этого добавить во все пробирки по 5,0 мл рабочего раствора реагента 3 и снова перемешать, оставить на 10 минут для развития окраски и измерить оптиче-

скую плотность проб против контрольной пробы через 10 минут при длине волны 537 (500-560) нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм.

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

Проведение анализа

При проведении анализа руководствоваться таблицей 2.

Таблица 2

Компоненты реакционной среды	Опытная проба	Контрольная проба
Реагент 1, мл	0,25	0,25
Содержимое пробирок прогреть при температуре +37°C в течение 5 минут.		
Сыворотка крови, мл	0,05	-
Пробы тщательно перемешать и инкубировать в течение 30 минут при температуре +37°C. Затем в пробирки добавить следующие компоненты:		
Реагент 2, мл	0,25	0,25
Сыворотка крови, мл	-	0,05

Пробы тщательно перемешать и выдержать в течение 20 минут при комнатной температуре, после этого внести в пробирки по 2,5 мл рабочего раствора реагента 3 и снова перемешать.

Измерить оптическую плотность опытной пробы против соответствующей контрольной пробы через 10 минут при длине волны 537 (500-560) нм. Окраска растворов стабильна не более 2 часов.

Расчеты

Активность АЛТ рассчитать при помощи калибровочного графика.

Условия хранения и эксплуатации набора

Набор должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при комнатной температуре (+18-25°C) в течение всего срока годности.

Срок годности набора - 12 месяцев.

Вскрытые флаконы с реагентом 1 и калибратором можно хранить при температуре +2-8°C в плотно закрытой посуде не более 6 месяцев.

Вскрытые флаконы с реагентом 2 и реагентом 3 можно хранить при комнатной температуре в закрытой посуде в течение всего срока годности.

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

Если активность АЛТ в анализируемом образце сыворотки крови превышает 1,67 мкмоль/(с×л), его следует развести физиологическим раствором в 2 раза, повторить анализ и полученный результат умножить на 2.

Для проведения анализа рекомендуется использовать полуавтоматические одноканальные пипетки со сменяемыми наконечниками, аттестованные на точность по значению средней дозы и сходимости результатов дозирования.

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

По вопросам, касающимся качества набора АЛТ-РФ-ОЛЬВЕКС, следует обращаться в ООО «Ольвекс Диагностикум» по адресу:

195197, г. Санкт-Петербург, пр. Обуховской обороны, 70.

Тел: (812) 567-84-46, (812) 567-83-02;

Факс: (812) 567-84-29

и в Институт государственного контроля лекарственных средств ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора по адресу:

117246, г. Москва, Научный проезд, д. 14 А.

Тел: (095) 120-60-95, 120-60-96.

Директор по науке

ООО «Ольвекс Диагностикум», к.б.н.



З.А.Тупикова

Заведующий кафедрой клинической
лабораторной диагностики СПбМАПО,
д.м.н., профессор



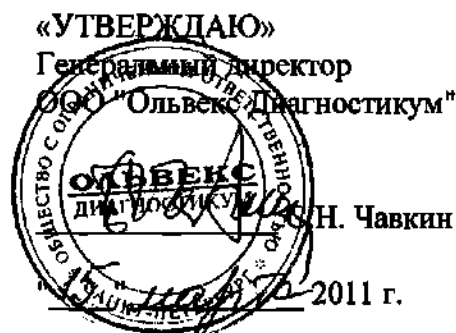
А.В.Козлов

Получено в приемное
до канцелярии 2/сентября 1916 г.

Получено в приемное
до канцелярии 2/сентября 1916 г.

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора
от _____ 2011 г. № _____



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения активности
аланинаминотрансферазы в сыворотке крови
(метод Райтмана-Френкеля)
(АЛТ-РФ-ОЛЬВЕКС)
(Взамен инструкции, утвержденной 04.08.2006 г.)

Назначение

Набор «АЛТ-РФ-ОЛЬВЕКС» предназначен для количественного определения активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) в сыворотке крови человека с фиксированным временем инкубации в клиничко-диагностических и биохимических лабораториях и в научно-исследовательской практике.

Набор рассчитан на проведение 200, 400 и 1000 определений при конечном объеме реакционной смеси 3,05 мл.

Принцип метода

АЛТ катализирует реакцию переаминирования между L-аланином и α -кетоглутаровой кислотой с образованием пировиноградной кислоты. Об активности фермента судят по приросту пировиноградной кислоты, образующей с 2,4-динитрофенилгидразином окрашенные гидразоны.

Активность АЛТ пропорциональна количеству образовавшихся гидразонов, которое определяется фотометрически при длине волны 537 (500-560) нм.

Состав набора

В состав набора реагентов входят следующие компоненты:

- реагент 1 (буфер-субстратная смесь), содержащая L-аланин, 100 ммоль/л; альфа-кетоглутаровую кислоту, 2,0 ммоль/л; натрий фосфорнокислый однозамещенный, 19 ммоль/л; натрий фосфорнокислый двузамещенный, 81 ммоль/л; азид натрия, 0,5 г/л; натрия гидроокись до pH 7,4, готов к применению - 1 флакон (50 мл), или 1 флакон (100 мл), или 1 флакон (250 мл), или 2 флакона (по 50 мл);
- реагент 2 (раствор 2,4-ДНФГ), содержащий 2,4-динитрофенилгидразин, 1,0 ммоль/л; соляную кислоту, 1,0 моль/л, готов к применению - 1 флакон (50 мл), или 1 флакон (100 мл), или 1 флакон (250 мл);
- реагент 3 (натрия гидроокись) концентрат, содержащий гидроокись натрия, 4,0 моль/л - 1 флакон (50 мл), или 1 флакон (100 мл), или 1 флакон (250 мл);
- калибратор, содержащий пируват натрия, 1,0 ммоль/л; азид натрия, 0,5 г/л; готов к применению - 1 флакон (2,0 мл) или 1 флакон (5,0 мл).

Аналитические характеристики

Линейная область определения активности АЛТ - в диапазоне от 0,03 до 1,67 мкмоль/(с×л), отклонение от линейности - не более 10%.

Чувствительность определения - не более 0,01 мкмоль/(с×л).

Коэффициент вариации результатов определений - не более 10%.

Окраска стабильна не более 2 часов.

Качество набора может проверяться при помощи отечественных или зарубежных контрольных сывороток, аттестованных данным методом.

Нормальные величины активности АЛТ в сыворотке крови составляют от 0,03 до 0,19 мкмоль/(с×л) или 0,1-0,68 ммоль/(ч×л).

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

Анализируемые образцы

Сыворотка крови без следов гемолиза.

Меры предосторожности

Потенциальный риск применения набора – класс 1.

Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

В состав компонентов набора входят азид натрия, соляная кислота и натрия гидроксид. Следует избегать их попадания на кожу и слизистые; при попадании немедленно промыть пораженное место большим количеством проточной воды. При попадании внутрь следует немедленно выпить 0,5 л теплой воды и вызвать рвоту.

При работе с набором необходимо соблюдать "Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического 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 использовать 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 инфекции.

Оборудование, материалы и реагенты:

- Спектрофотометр, длина волны 537 нм, или фотоэлектроколориметр, длина волны 500-560 нм, кювета с длиной оптического пути 1,0 см;
- термостат, поддерживающий температуру $+37 \pm 1^\circ\text{C}$;
- колбы вместимостью 100 мл;
- секундомер;
- пипетки, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,004-0,6 мл; 2,5 мл и 5,0 мл;
- пробирки стеклянные химические вместимостью 5,0-10 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

Подготовка к анализу

Реагенты 1, 2 и калибратор готовы к применению.

Перед определением содержимое флакона 3 (или аликвоту) разводят дистиллированной водой, свободной от карбонатов, в соотношении 1:9.

Полученный рабочий раствор реагента 3 можно хранить при комнатной температуре (+18-25°C) в плотно закрытом полиэтиленовом флаконе не более 3 месяцев.

Построение калибровочного графика

Подготовить пробы в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1

№ пробы	Калибратор, мл	Вода дистиллированная, мл	Реагент 2, мл	Ферментативная активность	
				мкмоль/(с×л)	ммоль/(ч×л)
1	0,004	0,596	0,500	0,022	0,08
2	0,020	0,580	0,500	0,112	0,40
3	0,050	0,550	0,500	0,278	1,00
4	0,100	0,500	0,500	0,556	2,00
5	0,200	0,400	0,500	1,112	4,00
6	0,300	0,300	0,500	1,668	6,00
контроль	-	0,600	0,500	-	-

Пробы тщательно перемешать и выдержать в течение 20 минут при комнатной температуре (+18-25°C), после этого добавить во все пробирки по 5,0 мл рабочего раствора реагента 3 и снова перемешать, оставить на 10 минут для развития окраски и измерить оптическую плотность проб против контрольной пробы через 10 минут при длине волны 537 (500-560) нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм.

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

Проведение анализа

При проведении анализа руководствоваться таблицей 2.

Таблица 2

Компоненты реакционной среды	Опытная проба	Контрольная проба
Реагент 1, мл	0,25	0,25
Содержимое пробирок прогреть при температуре +37°C в течение 5 минут.		
Сыворотка крови, мл	0,05	-
Пробы тщательно перемешать и инкубировать в течение 30 минут при температуре +37°C. Затем в пробирки добавить следующие компоненты:		
Реагент 2, мл	0,25	0,25
Сыворотка крови, мл	-	0,05

Пробы тщательно перемешать и выдержать в течение 20 минут при комнатной температуре, после этого внести в пробирки по 2,5 мл рабочего раствора реагента 3 и снова перемешать.

Измерить оптическую плотность опытной пробы против соответствующей контрольной пробы через 10 минут при длине волны 537 (500-560) нм. Окраска растворов стабильна не более 2 часов.

Расчеты

Активность АЛТ рассчитать при помощи калибровочного графика.

Условия хранения и эксплуатации набора

Набор должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при комнатной температуре (+18-25°C) в течение всего срока годности.

Срок годности набора - 18 месяцев.

Вскрытые флаконы с реагентом 1 и калибратором можно хранить при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ в плотно закрытой посуде не более 6 месяцев.

Вскрытые флаконы с реагентом 2 и реагентом 3 можно хранить при комнатной температуре ($+18-25^{\circ}\text{C}$) в закрытой посуде в течение всего срока годности.

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

Если активность АЛТ в анализируемом образце сыворотки крови превышает $1,67 \text{ мкмоль/(с}\times\text{л)}$, его следует развести физиологическим раствором в 2 раза, повторить анализ и полученный результат умножить на 2.

Для проведения анализа рекомендуется использовать полуавтоматические одноканальные пипетки со сменяемыми наконечниками, аттестованные на точность по значению средней дозы и сходимости результатов дозирования.

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

По вопросам, касающимся качества набора «АЛТ-РФ-ОЛЬВЕКС», следует обращаться в ООО «Ольвекс Диагностикум» по адресу:

195197, г. Санкт-Петербург, пр. Обуховской обороны, 70.

Тел: (812) 412-84-46, (812) 412-83-02;

Факс: (812) 412-84-29

и в Институт стандартизации и контроля лекарственных средств ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора по адресу:

117246, г. Москва, Научный проезд, д. 14 А.

Тел: (495) 120-60-95, 120-60-96.

Директор производства
ООО «Ольвекс Диагностикум»



Юшин К.В.

«Согласовано»

Заведующий кафедрой клинической
лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»

д.м.н., профессор



Долгов В.В.

Пронумеровано и прошнуровано
в количестве 6 (шести) листов

Генеральный директор  С.Н.Чавкин

