

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 2009 г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Пр. «Олаб»

С. Г. Марданлы

_____ 2009 г.



**ИНСТРУКЦИЯ
ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АКТИВНОСТИ АСПАРТАТАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ В СЫВОРОТКЕ И
ПЛАЗМЕ КРОВИ ПО МЕТОДУ РАЙТМАНА-ФРЕНКЕЛЯ**

(«АсАТ по Райтману-Френкелю»)

1. Назначение

Набор реагентов «АсАТ по Райтману-Френкелю» предназначен для количественного определения активности аспартатаминотрансферазы (АсАТ) в сыворотке и плазме крови динитрофенилгидразиновым методом в клинико-диагностических и биохимических лабораториях.

Набор рассчитан на проведение 800 определений при расходе по 0,25 мл реагентов 1 и 2 и 2,5 мл рабочего раствора реагента 3 на один анализ.

2. Характеристика набора

2.1. Принцип действия

В результате реакции переаминирования между L-аспартатом и альфа-кетоглutarовой кислотой под действием АсАТ образуются щавелевоуксусная и глутаминовая кислоты. Щавелевоуксусная кислота в процессе реакции превращается в пировиноградную кислоту. При добавлении 2,4-динитрофенилгидразина в щелочной среде образуется окрашенный гидразон пировиноградной кислоты, интенсивность окраски которого пропорциональна активности АсАТ и определяется фотометрически при длине волны 500 (500-560) нм.

2.2. Состав набора:

- Реагент 1 - субстратно-буферный раствор (L-аспарагиновая кислота, 0,1 моль/л; натрия гидроокись, 0,1 моль/л; альфа-кетоглutarовая кислота, 2,0 ммоль/л; калий фосфорнокислый однозамещенный, 0,016 моль/л; натрий фосфорнокислый двузамещенный, 0,084 моль/л; натрия азид, 7,7 ммоль/л) – 2 флакона (по 100 мл).
- Реагент 2 - 2,4-динитрофенилгидразин, 1,0 ммоль/л, в кислоте соляной, 1,0 моль/л – 2 флакона (по 100 мл).
- Реагент 3 - натрия гидроокись, 8,0 моль/л – 1 флакон (100 мл).
- Калибратор - калибровочный раствор натрия пировинограднокислого, 2,0 ммоль/л, в кислоте бензойной, 16,4 ммоль/л – 1 флакон (5,0 мл).

3. Аналитические характеристики набора

Линейная область определения – в диапазоне от 4,0 Е/л до 68 Е/л, отклонение от «линейности» – не более 10 %.

Чувствительность – не более 3,0 Е/л.

Коэффициент вариации результатов определения - не более 10 % .

Окраска стабильна в течение 30 мин.

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

Нормальные значения активности АсАТ

в сыворотке (плазме) крови человека - 4,0 - 12 Е/л.

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

4. Меры предосторожности при работе с набором

Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

Реагент 1 содержит азид натрия, реагент 2 - 2,4-динитрофенилгидразин, кислоту соляную, реагент 3 – натрия гидроокись. При работе с ними следует соблюдать осторожность и не допускать попадания на кожу и слизистые; при попадании немедленно промыть пораженное место большим количеством проточной воды. 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 набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

5. Оборудование, материалы и реагенты:

- Фотометрическое оборудование, длина волны 500 (500-560) нм, кювета с длиной оптического пути 1,0 см;
- термостат, поддерживающий температуру (37±1) °С;
- таймер;
- пробирки стеклянные вместимостью 10-12 мл;
- колба мерная вместимостью 2 л;
- пипетки, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,01 мл до 0,5 мл, 2,5 мл и 5,0 мл;
- флакон полиэтиленовый вместимостью 2 л;
- вода дистиллированная, не содержащая углекислоту;
- физиологический раствор (0,9% NaCl);
- перчатки резиновые или пластиковые.

6. Анализируемые пробы

Негемолизированная сыворотка и гепаринизированная или ЭДТА плазма крови. Сыворотку и плазму можно хранить не более 1 сут. при температуре (2-8) °С.

7. Проведение анализа

7.1. Подготовка к анализу

7.1.1. Реагент 1

Готов к применению.

После вскрытия флакона реагент 1 можно хранить при температуре (2-8) °С в плотно закрытом флаконе в течение срока годности набора.

7.1.2. Реагент 2

Готов к применению.

После вскрытия флакона реагент 2 можно хранить при комнатной температуре (18-25) °С в плотно закрытом флаконе в течение срока годности набора.

7.1.3. Приготовление рабочего раствора реагента 3 – рабочий раствор натрия гидроокиси

В мерную колбу вместимостью 2 л внести содержимое флакона с реагентом 3 и довести объем раствора до метки водой дистиллированной, не содержащей углекислоту. Приготовленный раствор перенести в полиэтиленовый флакон.

Рабочий раствор реагента 3 можно хранить в плотно закрытом полиэтиленовом флаконе при комнатной температуре не более 6 мес.

При приготовлении небольшого количества рабочего раствора, разбавить реагент 3 дистиллированной водой, не содержащей углекислоту в 20 раз (например, к 1,0 мл реагента 3 добавить 19 мл дистиллированной воды, не содержащей углекислоту).

7.1.4. Калибратор

Готов к применению.

После вскрытия флакона калибратор можно хранить при температуре (2-8) °С в плотно закрытом флаконе не более 6 мес.

7.1.5. Построение калибровочного графика

В 7 пробирок внести реагент 1, калибратор и воду дистиллированную в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1

№ пробирок	Реагент 1, мл	Калибратор, мл	Вода дистиллированная, мл	Активность АсАТ		
				Е/л	ммоль/(ч×л)	мккат/л
1	0,49	0,01	0,10	3,4	0,2	0,057
2	0,47	0,03	0,10	10	0,6	0,167
3	0,45	0,05	0,10	17	1,0	0,283
4	0,40	0,10	0,10	34	2,0	0,567
5	0,35	0,15	0,10	50	3,0	0,833
6	0,30	0,20	0,10	68	4,0	1,133
7	0,50	-	0,10	-	-	-

Содержимое пробирок тщательно перемешать, добавить по 0,5 мл реагента 2, тщательно перемешать путем встряхивания и выдержать при комнатной температуре (18-25) °С в течение 20 мин, после чего добавить в каждую пробирку по 5,0 мл рабочего раствора реагента 3, перемешать и выдержать при комнатной температуре в течение 10 мин. Измерить оптическую плотность проб (пробирки №№1-6) против контрольной (холостой) пробы (пробирка № 7) при длине волны 500 (500-560) нм в кювете с длиной оптического пути 1 см.

Калибровочный график построить, откладывая по оси ординат оптические плотности опытных проб (пробирки №№1-6), а по оси абсцисс – соответствующие им значения активности АсАТ, указанные в таблице 1.

7.2. Проведение анализа

Компоненты и анализируемые пробы отмерить в количествах, указанных в таблице 2.

Таблица 2		
Отмерить, мл	Опытная проба	Контрольная (холостая) проба
Реагент 1	0,25	0,25
Сыворотка (плазма) крови	0,05	-
Вода дистиллированная	-	0,05
Перемешать и выдержать при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 60 мин		
Реагент 2	0,25	0,25
Перемешать и выдержать при комнатной температуре $(18-25)^\circ\text{C}$ в течение 20 мин		
Рабочий раствор реагента 3	2,5	2,5

Содержимое пробирок тщательно перемешать путем встряхивания, выдержать при комнатной температуре в течение 10 мин и измерить оптическую плотность опытной пробы против контрольной (холостой) пробы при длине волны 500 (500-560) в кювете с длиной оптического пути 1 см. Окраска растворов стабильна в течение 30 мин.

Примечание. В сыворотке (плазме) крови больных диабетом содержится повышенное количество кетовеществ. В таких случаях контрольную (холостую) пробу готовить с сывороткой, которую добавляют в пробу после внесения реагента 2.

8. Регистрация результатов

Длина волны: 500 (500 – 560) нм;

Длина оптического пути: 1,0 см;

Температура анализа: $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ и $(18-25)^\circ\text{C}$;

Измерение: относительно контрольной (холостой) пробы.

9. Учет результатов

1. По калибровочному графику

Активность АсАТ определить по калибровочному графику. Для этого на оси ординат отметить оптическую плотность опытной пробы, а на оси абсцисс найти соответствующее ей значение активности АсАТ.

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

Примечание: 1 Е/л – ммоль/мин×л

10. Условия хранения и эксплуатации набора

Набор должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $(2-8)^\circ\text{C}$ в течение всего срока годности. Допускается хранение при температуре до 25°C не более 20 сут.

Срок годности набора – 1 год.

Реагент 1 после вскрытия флакона можно хранить при температуре $(2-8)^\circ\text{C}$ в плотно закрытом флаконе в течение срока годности набора.

Реагент 2 после вскрытия флакона можно хранить при комнатной температуре $(18-25)^\circ\text{C}$ в плотно закрытом флаконе в течение срока годности набора.

Рабочий раствор реагента 3 можно хранить при комнатной температуре в плотно закрытом полиэтиленовом флаконе не более 6 мес.

Калибратор после вскрытия флакона можно хранить при температуре (2-8) °С в плотно закрытом флаконе не более 6 мес.

Если активность АсАТ в исследуемом образце сыворотки (плазмы) крови превышает 68 Е/л, образец необходимо развести физиологическим раствором, повторить определение и полученный результат умножить на разведение.

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

По вопросам, касающимся качества набора «АсАТ по Райтману-Френкелю», следует обращаться по адресу 142530, Московская обл, г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1, ЗАО «ЭКОлаб»; тел/факс (49643) 3-30-93, 3-30-85 – отдел сбыта.

Начальник лаборатории
биохимии ЗАО «ЭКОлаб»



Т. М. Сиренко

СОГЛАСОВАНО:

Зав. кафедрой клинической лабораторной
диагностики ГОУ ДПО РМАПО Росздрава
д.м.н., профессор



В. В. Долгов

Подпись <u>В. В. Долгова</u>
удостоверяю: специалист по кадровой работе ГОУ ДПО РМАПО Росздрава
подпись: <u>М. И. Петухова</u>