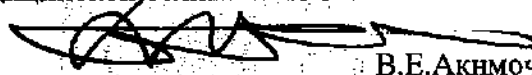


УТВЕРЖДАЮ

Руководитель Департамента государственного контроля лекарственных средств и медицинской техники МЗ РФ


" 8 " 10

В.Е.Ахмочкин
2002 г.

Копия верна:
Президент ЗАО "ЭКОлаб"

М.М.Марданлы С.Г.



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

(ЭКОлаб-АЛАТ по Райтману-Френкелю)

Рекомендована к утверждению комиссией по лабораторным реагентам
Комитета по новой медицинской технике МЗ РФ
(протокол № 4 от 27 мая 2002 г.)

Назначение

Набор реагентов ЭКОлаб-АЛАТ по Райтману-Френкелю предназначен для количественного определения активности аланинаминотрансферазы (АЛАТ) в сыворотке и плазме крови человека динитрофенилгидразиновым методом в клинико-диагностических и биохимических лабораториях.

Набор рассчитан на проведение 400 определений при расходе 0,5 мл реагентов 1 и 2 и 5,0 мл рабочего раствора реагента 3 на один анализ.

Принцип метода

В результате реакции переаминирования между L-альфа-аланином и альфа-кетоглутаровой кислотой под действием АЛАТ образуются глутаминовая и пировиноградная кислоты. При добавлении 2,4-динитрофенилгидразина в щелочной среде образуется окрашенный гидразон пировиноградной кислоты, интенсивность окраски которого пропорциональна активности АЛАТ и определяется фотометрически при длине волны 500 (500-560) нм.

Состав набора:

- Реагент 1: субстратно-буферный раствор (DL-альфа-аланин, 0,2 моль/л или L-альфа-аланин, 0,1 моль/л; альфа-кетоглутаровая кислота, 2,0 ммоль/л; калий фосфорнокислый однозамещенный, 0,016 моль/л; натрий фосфорно-

Инструкция составлена президентом ООО "ЭКОлаб" кандидатом мед. наук
Марданлы С.Г. и руководителем биохимической лаборатории МОНИКИ доктором мед.
наук, профессором Тишениной Р.С.

кислый 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).

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 АЛАТ в сыворотке и плазме крови человека – 4,0-12 Е/л.

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

Анализируемые пробы

Негемолизированная сыворотка и гепаринизированная или ЭДТА плазма крови.

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.

Оборудование, материалы и реагенты:

- Спектрофотометр, длина волны 500 нм, или фотозлектроколориметр, длина волны 500-560 нм, кювета с длиной оптического пути 1 см;
- термостат, поддерживающий температуру $+(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;

- секундомер;
- пробирки стеклянные вместимостью 10-12 мл;
- колба мерная вместимостью 2 л;
- пипетки, позволяющие отбирать объемы жидкости от 0,01 мл до 0,5 мл и 5,0 мл;
- флакон полиэтиленовый вместимостью 2 л;
- вода дистиллированная, не содержащая углекислоту;
- физиологический раствор (0,9% NaCl);
- перчатки резиновые или пластиковые.

Подготовка реагентов для анализа

Реагент 1

Готов к применению.

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

Реагент 2

Готов к применению.

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

Приготовление рабочего раствора реагента 3

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.

Калибратор

Готов к применению.

После вскрытия флакона калибратор можно хранить при температуре $+(2-8)^\circ\text{C}$ в плотно закрытом флаконе не более 6 мес.

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 АлАТ		
				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 $+(18-25)^\circ\text{C}$ 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 против дистиллированной воды при длине волны 500 (500-560) нм в кювете с длиной оптического пути 1 см.

Калибровочный график построить, откладывая по оси ординат разность оптических плотностей опытных (пробирки №№1-6) и контрольной (холостой) проб (пробирка № 7), а по оси абсцисс – соответствующие им значения активности АЛТ, указанные в таблице 1.

Проведение анализа

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

Таблица 2

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

Содержимое пробирок тщательно перемешать путем встряхивания, выдержать при комнатной температуре в течение 10 мин и измерить оптическую плотность опытной и контрольной (холостой) проб против дистиллированной воды 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 готовят с сывороткой, которую добавляют в пробу после внесения реагента 2.

Расчеты

Активность АЛТ определить по калибровочному графику. Для этого на оси ординат отметить разность оптических плотностей опытной и контрольной (холостой) проб, а на оси абсцисс найти соответствующее ей значение активности АЛТ.

Для перевода активности АЛТ, 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.

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) °C в плотно закрытом флаконе в течение срока годности набора.

Реагент 2 после вскрытия флакона можно хранить при комнатной температуре +(18-25) °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) °C в плотно закрытом флаконе не более 6 мес.

Если активность АЛАТ 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 ЭКОлаб-АЛАТ по Райтману-Френкелю, следует обращаться по адресу 142530, Московская обл, г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1, ООО “ЭКОлаб”; тел. (09643) 3-23-11 – отдел сбыта, 3-30-93 – ОБТК, факс (09643) 3-31-43 (код из Москвы 243) и в Институт Государственного контроля лекарственных средств ФГУ “НЦ ЭСМП” Минздрава России, 117246, г. Москва, В-246, Научный проезд, д. 14а, тел. (095) 120-60-95, 120-60-96.

Президент ООО “ЭКОлаб”
кандидат медицинских наук. наук



С.Г.Марданлы

Руководитель биохимической
лаборатории МОНИКИ
доктор медицинских наук, профессор



Р.С.Тишенина