

**УВАГА! ЗМІНЕНО ЧАС ІНКУБАЦІЇ**

СР	9094/2009
	07.11.2014

Погоджено
Перший заступник
Голови Державної Служби України
з лікарських засобів
О. А. Алексєєва
07 листопада 2014 р.

Інструкція
з використання набору реагентів
для визначення концентрації
аспартатамінотрансферази в сироватці, плазмі крові.
АСТ «СПЛ»

IN VITRO

P1	1 x 50 мл
P2	1 x 50 мл
P3	1 x 30 мл
Калібратор	1 x 4 мл

Зберігати при 2-8°C

Набір розрахований на 200 визначень з урахуванням холостих і калібрувальних проб при витраті робочого розчину відповідно цієї методики.

Принцип методу

В основі визначення активності АСТ з динітрофенілгідрозином лежить метод Райтмана-Френкеля. Аспартатамінотрансфераза у присутності а-кетоглутарата каталізує реакцію переамінування L - аспартата з утворенням пірувату.

АСТ

$$\text{а-кетоглутарат} + \text{L-аспартат} \rightarrow \text{L-глутамат} + \text{оксалацетат} \rightarrow \text{піруват}$$

Піруват з 2,4-динітрофенілгідрозином в лужному середовищі утворює динітрофенілгідрозон, інтенсивність забарвлення якого пропорційна активності АСТ і вимірюється на фотометрі.

Клінічне значення

АСТ - фермент, що бере участь у метаболізмі амінокислот в клітині. Фермент міститься в тканинах серця, печінки, скелетної мускулатури, нервовій тканині та нирках, у меншій мірі - в підшлунковій залозі, селезінці і легенях. Фермент локалізується як в цитоплазмі, так і в мітохондріях клітин, тому будь-яке пошкодження клітин призводить до збільшення його вмісту (активності) в крові.

У міокарді активність АСТ у 10 000 разів вище, ніж у сироватці крові. В еритроцитах АСТ міститься в кількості в 10 разів більше, ніж у сироватці.

Активність ферменту у жінок трохи нижче, ніж у чоловіків. При інфаркті міокарда активність АСТ у сироватці може підвищуватися в 2 - 20 разів, підвищену активність можна виявити ще до появи типових ознак інфаркту на ЕКГ. Існує залежність між розмірами некрозу в серцевому м'язі і рівнем АСТ у сироватці крові.

Наростання активності може свідчити як про розширення вогнища інфаркту, так і про залучення в процес інших органів і тканин, наприклад, печінки. Одночасне визначення активності двох амінотрансфераз (АЛТ і АСТ) є цінним діагностичним тестом. Активність АЛТ зростає при інфаркті міокарда, але в меншій мірі, ніж активність АСТ. Для уточнення діагнозу проводять розрахунок

E-mail: spainlab@spainlab.com.ua*Безкоштовна гаряча лінія: 0-800-500-561 (для стаціонарних телефонів)*

коефіцієнта де Рітиса: співвідношення активностей АСТ/АЛТ. У нормі це становить 1.33 ± 0.42 . При інфаркті міокарда активність АЛТ збільшується незначно, тому коефіцієнт де Рітиса різко зростає. Клінічний діагноз не повинен базуватися на одному показникові, необхідно враховувати клінічні та інші лабораторні дані.

Склад набору

1. **Реагент 1.** Субстрат: DL-Аспарат - 100 ммоль/л; α - кетоглютарат - 2 ммоль/л.
2. **Реагент 2.** Проявник: 2,4-динітрофенілгідразин (ДНФГ) - 1 ммоль/л.
3. **Реагент 3.** Натрію гідроксид 0.4 N концентрат 20x.
4. **Калібратор.** Розчин пірувату - 2.0 ммоль/л.
5. Інструкція з використання.
6. Паспорт.

Аналітичні характеристики

1. Лінійність вимірювального діапазону: 0.028 - 1.01 мккат/л.
Відхилення від лінійності не перевищує 6%. Якщо отримані результати були більше, ніж межі лінійності розведіть зразки NaCl 9 г/л та помножте результат на фактор розведення.
2. Чутливість не менш 0.028 мккат/л .
3. Коефіцієнт варіації результатів визначень - не більш 6%.

Матеріал для дослідження

Сироватка або плазма крові. Досліджувані сироватки або плазми повинні бути ретельно відокремлені від формених елементів крові не пізніше, чим через 1 годину після взяття крові. Уникайте використання мутних, ліпідних та гемолітичних зразків.

Перелік необхідного устаткування

- Спектрофотометричне або колориметричне обладнання з довжиною хвилі 505 нм.
- Відповідні кювети з товщиною оптичного шару 1 см.
- Термостатична водяна баня з 37 °С.
- Загальне лабораторне обладнання.

Прим: Адаптації до напівавтоматичних і автоматичних приладів надаються за запитом

Підготовка реагентів

Перед використанням набір витримати при кімнатній температурі протягом 30 хвилин.

P1, P2 готові до використання.

P3 розвести дистильованою водою 1:19 (в 20 раз)

Проведення аналізу

1. Умови вимірювання:
довжина хвилі 505 нм (500-600 нм)
кювета з товщиною оптичного шару 1 см
температура 15-25°C
2. Налаштувати прилад на нуль відносно дистильованої води.
3. Наповнення кювети: компоненти реакційної суміші відібрати та вносити в об'ємах, вказаних в таблиці.

Відмірити, мл	Дослідна проба	Контрольна (холоста) проба
P1, мл	0.25	0.25
Змішати, інкубувати 5 хв. при 37°C на водяній бані		
Сироватка крові, мл	0.05	-
Фізіологічний р-н, мл		0.05
Змішати та інкубувати 60 хв. при 37°C. на водяній бані		
P2, мл	0.25	0.25
Змішати та інкубувати 20 хв. при кімнатній температурі		
P3, мл	2.5	2.5
Змішати та інкубувати 5 хв. при кімнатній температурі		

4. Виміряти оптичну щільність дослідної проби (E1) проти контрольної (холостої) проби.



Забарвлення стійке як мінімум 30 хв.

Прим. Об'єми реагенту та зразку можуть бути пропорційно змінені відповідно до робочого об'єму кювети використовуваного аналізатора.

Розрахунок результатів

Розрахунок активності АСТ в сироватці крові проведіть по калібрувальній кривій.

Компоненти для реакційної суміші для побудови графіку відберіть в кількостях, вказаних в таблиці:

№/п	Калібратор	Вода дист. мл	P1	P2	Активність АСТ	
					Од/л	мккат/л
1	-	0.1	0.5	0.5	-	-
2	0.05	0.1	0.45	0.5	17	0.28
3	0.1	0.1	0.4	0.5	34	0.556
4	0.15	0.1	0.35	0.5	50	0.833
5	0.2	0.1	0.3	0.5	67	1.111
6	0.25	0.1	0.25	0.5	83	1.39

Після додавання P2 проби щільно перемішати, витримати при кімнатній температурі 20 хв..

Додати во всі пробірки P3 по 5 мл, витримати 5-10 хв. Виміряти оптичну щільність проб № 2-6 проти холостої проби №1.

Забарвлення стабільне 30 хв.

Побудуйте калібрувальну криву, визначити концентрацію АСТ в дослідних зразках.

Референтні величини

Ґрунтуючись на результатах досліджень, проведених лабораторіями, рекомендуємо користуватися нормами, приведеними нижче. Разом з тим, відповідно до правил GLP (Гарної лабораторної практики), кожна лабораторія повинна сама визначити для себе параметри норми, характерні для обстежуваної популяції.

Нормальні рівні АСТ в сироватці крові становить:

0.028-0.125 мккат/л (0.1-0.45 мкмоль/ч*мл) при температурі 37°C.

Перехід в додаткові одиниці: $\text{Од/л} \times 0.01667 = \text{мккат/л}$
 $\text{мккат/л} \times 3.6 = \text{мкмоль/ч*мл}$

Контроль якості

Контроль якості рекомендується здійснювати, використовуючи наступний контрольний матеріал: контрольні сироватки «КОНТРОЛЬ НОРМА Biog», «КОНТРОЛЬ ПАТОЛОГІЯ Biog» (Spinreact, S.A. Іспанія), контрольні сироватки «Lyoporm HUM N, P» (Чехія), «Сормау Serum HN, HP» (Польща), «ФИЛО-НОРМ, ФИЛО-ПАТ» (Україна). Якщо значення контролю виходять за межі встановленого діапазону, перевірте апаратуру, реактиви та можливі технічні проблеми. Кожна лабораторія повинна встановити свої власні схеми контролю якості та коригуючі дії, якщо контроль не відповідає допустимим нормам.

Зберігання та стабільність

Усі компоненти набору стабільні до закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці, при зберіганні їх щільно закритими при 2-8°C, в захищеному від світла місці і уникаючи забруднення під час їх використання.

Не використовуйте реактиви після закінчення терміну придатності (1 рік).



СР	9094/2009
	07.11.2014

ТОВ «СпайнЛаб»
61050, м. Харків,
вул. Франківська, 14
тел. (057) 768-07-14

Паспорт
Набір реагентів для визначення концентрації
аспартатамінотрансферази в сироватці, плазмі крові
АСТ «СПЛ»

IN VITRO

Серія **24-501/2-1**

Дата виготовлення **06.04.2015**

Термін придатності **06.04.2016**

Зберігати при 2-8°C

№/п	Показник	Вимоги ТУ У 24.4-36035842-001:2009	Результати контролю
Фізико-хімічні показники			
1. Зовнішній вигляд реагентів			
1.1	Р1. Субстрат: DL-Аспарат - 100 ммоль/л; α- кетоглутарат - 2 ммоль/л.	рідкий прозорий розчин	відповідає
1.2	Р2.Проявник: 2,4-динітрофенілгідразин (ДНФГ) - 1 ммоль/л.	світло-жовтий прозорий розчин	відповідає
1.3	Р3. Натрію гідроксид 0.4 N концентрат 20x	рідкий прозорий розчин, сл. мутний	відповідає
1.4	Калібратор. Розчин пірувату - 2.0 ммоль/л	рідкий прозорий розчин	відповідає
2. рН реагентів			
2.1	Р1	7.4 ± 0.2	відповідає
3. Показники правильності визначення			
3.1	Чутливість не менш, мккат/л	0.028	відповідає
3.2	Лінійність в діапазоні концентрацій, мккат/л	0.028-0.7 ± 6 %	відповідає
3.3	Коефіцієнт варіації	± 6 %	відповідає
4. Комплектація			
4.1	Р1	1 фл. х 50 мл	відповідає
4.2	Р2	1 фл. х 50мл	відповідає
4.3	Р3	1 фл. х 30 мл	відповідає
4.3	Калібратор.	1 фл. х 4 мл	відповідає

Набір розрахований на 200 визначень з урахуванням холостих і калібрувальних проб при витраті робочого розчину відповідно цієї методики.

Термін зберігання – 1 рік з дня виготовлення.

Висновок ВТК: Набір протестован на контрольному матеріалі згідно системи контролю якості ТОВ СПАЙНЛАБ.

Відповідає ТУ У 24.4-36035842-001:2009.

E-mail: spainlab@spainlab.com.ua

Безкоштовна гаряча лінія: 0-800-500-561 (для стаціонарних телефонів)