



Інструкція з використання набору реагентів для визначення концентрації аланінамінотрансферази в сироватці або плазмі крові АЛТ СпЛ

IN VITRO

Зберігати при 2-8°C

Принцип методу

В основі визначення активності АЛТ з динітрофенілгідрозином лежить метод Райтмана-Френкеля. Аланінамінотрансфераза у присутності α -кетоглутарата каталізує реакцію переамінування L-аланіну з утворенням пірувату.

L-аланін + α -кетоглутарат $\xrightarrow{\text{АЛТ}}$ глутамат + піруват

Піруват з 2,4-динітрофенілгідрозином в лужному середовищі утворює динітрофенілгідрозон, інтенсивність кольору пропорційна концентрації АЛТ в зразку.

Клінічне значення

АЛТ - фермент, що бере участь у метаболізмі амінокислот в клітині.

Найбільший вміст у печінки, нирках, підшлунковій залозі, серцевому м'язі, скелетних м'язах. У клітині фермент локалізується в цитоплазмі, тому будь-яке пошкодження клітин призводить до збільшення його вмісту (активності) в крові. Органічні ураження при гострих або хронічних захворюваннях, що супроводжуються некрозом клітин будь-якої етіології, призводять до виходу АЛТ з області ураження в кров'яне русло, що призводить до підвищення їх активності в крові. Збільшення активності АЛТ у сироватці крові найбільш характерно при різних захворюваннях печінки, що супроводжуються некрозами (гепатити, токсичний вплив). АЛТ є показником оцінки тяжкості перебігу вірусних гепатитів В і С. 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 (аспартатамінотрансфераза). Для уточнення діагнозу проводять розрахунок коефіцієнта де Рітиса: співвідношення активностей АСТ/АЛТ. У нормі це становить 1.33 ± 0.42 . Різке перевищення цього показника свідчить про ураження серцевого м'яза. Також у якості біомаркеру в діагностиці інфаркту міокарда рекомендується використовувати визначення активності креатинфосфокінази МВ-типу (КФК-МВ).

Зниження коефіцієнта до 0.6 - 0.8 характерно при некрозі печінкових клітин при вірусних гепатитах.

Клінічний діагноз не повинен базуватися на одному показникові, необхідно враховувати клінічні та інші лабораторні дані.

Склад набору

1. **Реагент 1.** Субстрат: DL-Аланін - 200 ммоль/л; α -кетоглутарат - 2 ммоль/л.
2. **Реагент 2.** Проявник: 2,4-динітрофенілгідрозин - 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, ніж 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 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 (у 20 разів)

Проведення аналізу

1. Умови вимірювання:

довжина хвилі 505 (500-600) нм

кювета з товщиною оптичного шару 1 см

температура 15-25-37°C

2. Налаштувати прилад на нуль відносно дистильованої води.

3. Наповнення кювети: компоненти реакційної суміші відібрати та вносити в об'ємах, вказаних в таблиці.

	Макроаналіз		Мікроаналіз	
	Дослідна проба	Холоста проба	Дослідна проба	Холоста проба
P1, мл	0.4	0.4	0.1	0.1
Змішати, інкубувати 3 хв. при 37°C на водяній бані				
P2, мл	-	0.4	-	0.1
Сироватка, мл	0.08	0.08	0.02	0.02
Змішати та інкубувати 60 хв. при 37°C на водяній бані				
P2, мл	0.4	-	0.1	-
Змішати та інкубувати 20 хв. при кімнатній температурі				
P3, мл	4.0	4.0	1.0	1.0
Змішати та інкубувати 10 хв. при кімнатній температурі				

4. Виміряти оптичну щільність дослідної проби (E1) проти відповідної холостої проби. Забарвлення стійке як мінімум 60 хв.

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

Розрахунок результатів

Розрахунок активності АЛТ в сироватці крові проведіть по калібрувальній кривій.

Вміст піровиноградної кислоти в калібрувальній пробі:

	Калібрувальні крапки				
	1	2	3	4	5
мкмоль	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
мкг	4.4	8.08	17.6	26.4	35.2
Активність в мкмоль/(год x мл)	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0
Активність в мккат/л	0.139	0.278	0.556	0.833	1.11

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

	Калібрувальні крапки	Холоста



	1	2	3	4	5	проба
Р1, мл	0.475	0.45	0.4	0.35	0.3	0.5
Калібратор, мл	0.025	0.05	0.1	0.15	0.2	-
Дист. вода/фіз.розчин, мл	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Р2, мл	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Змішати та інкубувати 20 хв. при кімнатній температурі						
Р3, мл	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
<p>Змішати та інкубувати 10 хв. при кімнатній температурі. Виміряти оптичну щільність калібрувальних проб проти холостої проби. Забарвлення стабільне протягом 60 хв. Побудуйте калібрувальну криву, визначити концентрацію АЛТ в дослідних зразках.</p>						

Референтні величини

Грунтуючись 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 АЛТ в сироватці крові становить:
 0.028-0.19 мккат/л (0.1-0.68 мкмоль/ч*мл) при температурі 37°C.

Перехід в додаткові одиниці: Од/л x 0.01667 = мккат/л.
 мккат/л x 3.6 = мкмоль/ч*мл

Контроль якості

Контроль якості рекомендується здійснювати, використовуючи наступний контрольний матеріал: «СпЛ Контроль НОРМА», «СпЛ Контроль ПАТОЛОГІЯ» («Лабораторія Гранум», Україна); «КОНТРОЛЬ НОРМА Biog», «КОНТРОЛЬ ПАТОЛОГІЯ Biog» (Spinreact, S.A. Іспанія), «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 (12 міс.).