



Інструкція з використання набору реагентів для визначення концентрації аспаратамінотрансферази в сироватці або плазмі крові АСТ СпЛ

IN VITRO

Зберігати при 2-8°C

Набір розрахований на 60 макро-, 125 напівмікро- або 250 мікрОВизначень з урахуванням холостих та калібрувальних проб при витраті робочого розчину відповідно цієї методики.

Принцип методу

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

АСТ

а-кетоглутарат + L- аспарат → L -глутамат+ оксалацетат → 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 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- кетоглутарат - 2 ммоль/л.
2. **Реагент 2.** Проявник: 2,4-динітрофенілгідрозин (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 разів)

Проведення аналізу

1. Умови вимірювання:

довжина хвилі 505 нм (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 АСТ в сироватці крові проведіть по калібрувальній кривій.

Вміст пірвіноградної кислоти в калібрувальній пробі:

	Калібрувальні крапки				
	1	2	3	4	5
ммоль/л	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
мкг/мл	4.4	8.8	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 проба
	1	2	3	4	5	
P1, 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
P2, мл	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Змішати та інкубувати 20 хв. при кімнатній температурі						
P3, мл	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
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 АСТ в дослідних зразках.						

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 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:

Од/л x 0.01667 = мккат/л.

мккат/л x 3.6 = мкмоль/ч*мл

Відтворюваність:

	Внутрисерійна (n=20)		Міжсерійна (n=20)	
Значення, Од/л	45,6	148	42,4	151
SD	0,55	0,56	1,39	4,28
CV, %	1,13	0,37	3,12	2,81

Порівняння методів

Точність: результати отримані при використанні реагентів СпайнЛаб (y), при порівнянні з іншими комерційними реагентами (x) систематичних відхилень не виявлено.

Порівняння було проведено на 50 зразках.

Результати:

Коефіцієнт кореляції (r)²: 0,99827

Рівняння регресії: $y=1,039x - 0,331$

Результати характеристик точності залежать від аналізатору, що використовується.

Специфічність

Антикоагулянти (гепарин, ЕДТА, оксалат, флуорид) не впливають на визначення АСТ.

Контроль якості

Контроль якості рекомендується здійснювати, використовуючи наступний контрольний матеріал: «СпЛ Контроль НОРМА» («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.).

Транспортування

Набори транспортують всіма видами закритого транспорту при температурі до 25°C.

Допускається транспортування при середньодобовій температурі 37°C не більше 72 годин.