

DAC-SpectroMed s.r.l.

MD-2012, Молдова, г. Кишинев, ул. Армянская, 47, кв. 64
Тел.: /+37322/ 574900, 574922/23; факс: /+37322/ 574920

Email: office@dacspectromed.com
www.dacspectromed.com

PT MD 11-38623324-002:2002

ALT - DAC

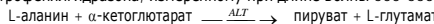
АЛАНИНАМИНОТРАНСФЕРАЗА ФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ПО РАЙТМАНУ-ФРЕНКЕЛЮ

Только для диагностики «in vitro»
Хранить при 2-8°C

Код 2008A1200 400 тестов

ПРИНЦИП МЕТОДА

Аланинаминотрансфераза (ALT) катализирует обратимый перенос аминогрупп аланина на α -кетоглутарат посредством реакций, описанных ниже. Активность ALT пропорциональна содержанию динитрофенилгидразона, измеренному при длине волны 500-550 nm.



Пируват + 2,4-динитрофенилгидразин \longrightarrow динитрофенилгидразон

СОСТАВ НАБОРА

Reagent A	pH 7,4
L-аланин	0,1 mol/l
α -кетоглутаровая кислота	2 mmol/l
Фосфатный буфер	0,1 mol/l
Reagent B	
2,4-динитрофенилгидразин	1 mmol/l
Reagent C	
Гидроксид натрия	2,0 mol/l
Reagent S	2,5 ml
Калибровочный раствор пирувата	2,0 mmol/l

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Реагенты стабильны при 2-8°C до срока, указанного на этикетке. В Reagent C допускается выпадение осадка.

ОБРАЗЦЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Негемолизирующая сыворотка.
ALT в сыворотке при 2-8°C стабильна 7 дней.

РЕФЕРЕНТНЫЕ ВЕЛИЧИНЫ

0,10-0,68 mmol/h x l = 28-190 nmol/s x l = 1,7 - 11,4 IU/l
Данные величины ориентировочны, рекомендуется определение собственных референтных значений в каждой лаборатории.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для контроля хода реакции и процедуры измерения рекомендуется использовать нормальные и патологические контрольные сыворотки.

Каждая лаборатория должна установить собственную внутреннюю систему контроля качества.

ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Анализатор, спектрофотометр, фотометр с фильтром 500-550 nm. Термостат или баня водяная 37°C. Дозаторы на 25,0 μ l, 0,25 ml и 2,5 ml. Секундомер.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Данный набор предназначен только для диагностики in vitro. Образцы анализов пациентов должны рассматриваться как потенциально опасные и обрабатываться как инфекционные. При использовании набора следует соблюдать правила безопасности при работе с едкими и ядовитыми веществами.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧИХ РЕАГЕНТОВ

Reagent A, Reagent B и Reagent S готовы к использованию. **Приготовление 0,4 M NaOH:** Reagent C количественно развести в мерной колбе дистиллированной водой, свободной от карбонатов, до объема, указанного на этикетке. Хранить в полиэтиленовом сосуде и использовать до появления осадка.

ПРОЦЕДУРА ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Постановка параллельных проб обязательна!

Метод:	по Райтману-Френкелю
Длина волны:	500-550 nm
Температура:	18-25/37°C
Бланк:	по реагенту

1. Внесите в маркированные пробирки:

	Образец	Бланк
Reagent A	0,25 ml	0,25 ml
Дистиллированная вода	-	0,05 ml
Сыворотка крови	0,05 ml	-

2. Перемешайте и инкубируйте 30 минут при 37°C.
3. Добавьте в маркированные пробирки по 0,25 ml Reagent B.
4. Перемешайте и инкубируйте 20 минут при 18-25°C.
5. Добавьте в маркированные пробирки по 2,5 ml 0,4 M NaOH.
6. Перемешайте и инкубируйте 10 минут при 18-25°C.

7. Измерьте абсорбцию опытной пробы относительно **Бланка** при длине волны 500-550 nm. Окраска стабильна 30-40 минут. При необходимости можно пропорционально изменить объемы компонентов смеси в соотношении:

Сыворотка(дист. вода): Reagent A: Reagent B: 0,4 M NaOH = 1:5:5:50

РАСЧЕТЫ

Содержание ALT рассчитайте по калибровочному графику.

ПОСТРОЕНИЕ КАЛИБРОВОЧНОГО ГРАФИКА

1. Для построения калибровочного графика подготовьте пробы согласно таблице:

Раствор	Номера проб				
	1	2	3	4	5
Дистиллир. вода, ml	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Reagent S, ml	-	0,05	0,10	0,15	0,20
Reagent A, ml	0,50	0,45	0,40	0,35	0,30
Reagent B, ml	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Активность ALT, mmol/h x l	0	1	2	3	4

2. Перемешайте и инкубируйте 20 минут при 18-25°C.
 3. Добавьте в маркированные пробирки по 5,0 ml 0,4 M NaOH.
 4. Перемешайте и инкубируйте 10 минут при 18-25°C.
 5. Измерьте абсорбцию со 2 по 5 пробы относительно первой пробы. Длина волны 500-550 nm.
 6. Активность ALT в пробах соответствует таблице.
 7. Постройте график зависимости абсорбции от активности фермента.
- 1 mmol/h x l = 278 nmol/s x l = 16,7 IU/l

МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Предел чувствительности: 0,36 mmol/h x l = 100 nmol/s x l.

Предел линейности: 4,2 mmol/h x l = 1170 nmol/s x l.

При более высоких значениях разведите образец 3 % раствором альбумина в физиологическом, и повторите измерение. Результат умножьте на коэффициент разведения.

Коэффициент вариации < 7 %.

Интерференция:

Повышенная концентрация веществ, содержащих кетогруппу, вызывает ложное завышение активности фермента, поэтому для больных диабетом необходимо поставить холостую пробу, в которую внести сыворотку после добавления Reagent C. Данные метрологические характеристики были получены на анализаторе. Результаты могут варьировать в зависимости от используемого оборудования или процедуры определения.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Аминотрансферазы катализируют образование глютаминовой кислоты из 2-оксиглутарата путем переноса аминогрупп. В норме ALT присутствует во многих тканях, но наибольшие концентрации определяются в печени и почках.

Сывороточная концентрация ALT повышается при гепатите и других заболеваниях печени, сопровождающихся некрозом гепатоцитов: инфекционном мононуклеозе, холестазах, циррозе, метастатической карциноме печени, белой горячке и при назначении гепатотоксических лекарственных средств, таких как опаты, салицилаты или ампицилин^{4,5}.

DAC-SpectroMed s.r.l.

MD-2012, Moldova, or. Chisinau, str. Armenească 47, ap. 64
Tel.: /+3732/ 574900, 574922/23; fax: /+3732/ 574920

Email: office@dacspectromed.com
www.dacspectromed.com

PT MD 11-38623324-002:2002

ALT - DAC

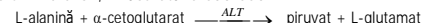
ACTI VI TATEA ALANI NAMI NOTRANSFERAZE METODA REI TMAN-FRENCHEL

Numai pentru diagnosticare «in vitro»
A se păstra la 2-8°C

Cod 2008A1200 400 determinări

PRINCIPIUL METODEI

Alaninaminotransferaza (ALT) catalizează transferul reversibil al aminogrupelor de la alanină către α -cetoglutarat conform reacției descrise mai jos. Activitatea ALT este proporțională conținutului de dinitrofenilhidrazon, măsurată la 500-550 nm.



Piruvat + 2,4-dinitrofenilhidrazină \longrightarrow dinitrofenilhidrazon

COMPONENȚA SETULUI

Reagent A	pH 7,4
L-alanină	0,1 mol/l
Acid α -cetoglutaric	2 mmol/l
Fosfați	0,1 mol/l
Reagent B	
2,4-dinitrofenilhidrazină	1 mmol/l
Reagent C	
Hidroxid de sodiu	2,0 mol/l
Reagent S	2,5 ml
Soluție de piruvat pentru calibrare	2,0 mmol/l

PĂSTRAREA ȘI STABILITATEA REAGENȚILOR

Reagenții sunt stabili la 2-8°C până la data indicată pe etichetă. În Reagent C se admite apariția precipitatului.

PROBE

Ser. Nu se va utiliza serul hemolizat.
ALT in ser este stabilă la 2-8°C 7 zile.

VALORI DE REFERINȚĂ

0,10-0,68 mmol/h x l = 28-190 nmol/s x l = 1,7 - 11,4 IU/l
Aceste valori sunt orientative. Se recomandă stabilirea diapazonului de referință în laboratorul dat

CONTROLUL CALITĂȚII

Pentru controlul mersului reacției și a procedurii de măsurare se recomandă de folosit seruri normale și patologice pentru control. Se recomandă stabilirea sistemului intern de control în laboratorul dat.

ECHIPAMENT ADIȚIONAL

Analizor, spectrofotometru sau fotometru cu filtrul 500-550 nm. Baie de apă sau termostată 37°C. Cronometru. Dozatoare 25,0 μ l, 0,25 ml și 2,5 ml.

PRECAUȚII

Setul este destinat numai pentru diagnosticare in vitro. Probele pacienților vor fi considerate ca material potențial contagios și se vor prelucra analogic celor contagioase. La utilizarea setului se vor respecta regulile de securitate prevăzute pentru lucrul cu substanțe toxice.

PREPARAREA REAGENȚILOR DE LUCRU

Reagentul A, Reagentul B și Reagentul S sunt gata de utilizare. Prepararea soluției de 0,4 M NaOH: Reagentul C se va dilua cu apă distilată, care nu conține carbonați, într-o retortă cotată până la volumul indicat pe etichetă. Se va păstra într-un vas de polietilenă și se va utiliza până la apariția sedimentului.

METODA DE LUCRU

Efectuarea probelor paralele este obligatorie!

Metoda:	Reitman-Frenchel
Lungimea de undă:	500-550 nm
Temperatura :	18-25/37°C
Instalarea zero:	după reagent

1. Se va pipeta în eprubetele marcate:

	Proba	Blanc
Reagent A	0,25 ml	0,25 ml
Apă distilată	-	0,05 ml
Ser sanguin	0,05 ml	-

2. Se va amesteca și se va incuba 30 minute la 37°C.
3. Se va adăuga în eprubete cite 0,25 ml Reagent B.
4. Se va amesteca și se va incuba 20 minute la 18-25°C.
5. Se va adăuga în eprubete cite 2,5 ml 0,4 M NaOH.
6. Se va amesteca și se va incuba 10 minute la 18-25°C.
7. Se va măsura absorbția Probei contra Blanc la lungimea de undă 500-550 nm. Culoarea este stabilă 30-40 min. La utilizarea cuvelor de altă capacitate (decît cele propuse) se va mari proporțional volumul componentelor amestecului. Ser (apa distilată): Reagent A: Reagent B: 0,4 M NaOH = 1:5:5:50.

CALCULE

Activitatea ALT se va calcula utilizând curba de calibrare.

TRASAREA CURBEI DE CALIBRARE

1. Pentru trasarea curbei de calibrare se vor prepara probele conform tabelului:

Soluție	Numărul probei				
	1	2	3	4	5
Apă distilată, ml	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Reagent S, ml	-	0,05	0,10	0,15	0,20
Reagent A, ml	0,50	0,45	0,40	0,35	0,30
Reagent B, ml	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Activitatea ALT, mmol/h x l	0	1	2	3	4

2. Se va amesteca și se va incuba 20 minute la 18-25°C.
3. Se va adăuga în eprubete cite 5,0 ml 0,4 M NaOH.
4. Se va amesteca și se va incuba 10 minute la 18-25°C.
5. Se va măsura absorbția probelor de la 2 până la 5 contra primei probe. Lungimea de undă 500-550 nm.
6. Activitatea ALT în probe corespunde tabelului.
7. Se va trasa curba dependenței absorbției de activitatea fermentului. 1 mmol/h x l = 278 nmol/s x l = 16,7 IU/l

CARACTERISTICI METROLOGICE

Limita sensibilității: 0,36 mmol/h x l = 100 nmol/s x l.
Limita linearității: 4,2 mmol/h x l = 1170 nmol/s x l. Pentru valori mai ridicate proba se va dilua cu soluție de albumină 3%. În calitate de solvent pentru prepararea soluției de albumină se va utiliza soluția fiziologică. Se va repeta măsurarea. Rezultatul se va înmulți la coeficientul de diluție. Coeficientul de variație < 7 %.

Interferențe: Nivelul ridicat al substanțelor care conțin ceto-grupe provoacă o majorare falsă a activității fermentului, din acest motiv probele colectate de la bolnavii care suferă de diabet zaharat se vor efectua în paralel cu o probă nulă, în care se va pipeta ser după adăugarea Reagentului C. Aceste caracteristici metrologice au fost obținute la utilizarea analizorului. Rezultatele pot varia în dependență de echipamentul utilizat sau procedura de determinare.

CARACTERISTICI DIAGNOSTICE

Aminotransferaza catalizează formarea acidului glutaminic din 2-oxoglutarat datorită transferului aminogrupelor. ALT, în limitele valorilor normale, este prezentă în multe țesuturi iar concentrația mai sporită se determină în ficat și rinichi. Concentrația ALT în ser se mărește în cazul hepatitei și altor boli ale ficatului însoțite de necroza hepatocitelor: mononucleoză infecțioasă, colestaze, ciroza carcinomă metastatică a ficatului, delir alcoolic și la administrarea preparatelor hepatotoxice: opiacee, salicilați și ampicilin^{4,5}. Diagnosticul clinic se va stabili în baza integrării datelor clinice și de laborator.

DAC-SPECTROMED SRL
 47, Armeneasca, str., apt. 64, Chisinau MD-2012 Moldova
 Tel.: +37322/ 574900, 574922/23; fax: +37322/ 574920
 Email: office@dacspectromed.com
 www.dacspectromed.com
 PT MD 11-38623324-002:2002

ALT - DAC

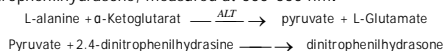
ALANINE AMINO TRANSFERASE
 PHOTOMETRIC METHOD BU RAITMAN-FRENKEL

For «in vitro» diagnostic use only
 Store at 2-8°C

Cod 2008A1200 400 tests

PRINCIPLE

Alanine aminotransferase (ALT) catalyzes the reversible transfer of the alanine amino groups to α-ketoglutarate by reactions, described below. The activity of ALT is proportional to content of dinitrophenylhydrazone, measured at 500-550 nm.



CONTENTS AND COMPOSITION

Reagent A	pH 7,4
L-alanine	0,1 mol/l
α-ketoglutaric acid	2 mmol/l
phosphate buffer	0,1 mol/l
Reagent B	
2,4-dinitrophenylhydrazine	1 mmol/l
Reagent C	
sodium hydroxide	2,0 mol/l
Reagent S	2,5 ml
calibration solution of sodium pyruvate	2,0 mmol/l

STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Reagents are stable at 2-8°C until the expiry date shown on the label.

SAMPLES

Serum free of Hemolysis.
 ALT in serum is stable for 7 days at 2-8°C.

REFERENCE VALUES

0,10-0,68 mmol/h x l = 28-190 nmol/s x l = 1,7 - 11,4 IU/l
 These ranges are given for orientation only; each laboratory should establish its own reference ranges.

QUALITY CONTROL

It is recommended to use the Sera N and Sera P to verify the performance of the measurement procedure.
 Each laboratory should establish its own internal Quality Control scheme and procedures for corrective action if controls do not recover within the acceptable tolerances.

ADDITIONAL EQUIPMENT

Analyzer, spectrophotometer or photometer with filter 500-550 nm.
 Water bath 37°C. Stopwatch.
 Pipettes for 25,0 µl, 0,25 ml, and 2,5 ml.

PRECAUTION

For in vitro diagnostics only.
 Handle all patients' samples as potentially dangerous and treat as infectious. Precautions established for work with caustic and toxic substances should be observed while using the reagents.

REAGENT PREPARATION

Reagent A, Reagent B and Reagent S are ready to use.
 Preparation of 0,4 M NaOH: Dilute Reagent C in volumetric flask with distilled water, free from carbonates, up to volume specified on a label.
 Store in polyethylene bottle and use until appearance of sediment.

PROCEDURE

Testing of parallel samples is obligatory!
 Assay conditions
 Wavelength: 500-550 nm
 Temperature: 18-25/37°C
 Cuvette: 1 cm light path
 Read against: against reagent
 Method: Raitman-Frenkel

1. Pipette in labeled tubes:

	<i>Tested sample</i>	<i>Control sample</i>
Reagent A	0,25 ml	0,25 ml
Distilled water	-	0,05 ml
Blood serum	0,05 ml	-

- Mix and incubate for 30 minutes on water bath at 37°C.
- Add in labeled tubes 0,25 ml of Reagent B.
- Mix and incubate for 20 minutes at 18-25°C.
- Add in labeled tubes 2.5 ml of 0.4 M NaOH.
- Mix and incubate for 10 minutes at 18-25°C.

7. Measure the absorbance of tested sample relative to control sample.
 Wave length is 500-550 nm. Coloration is stable for 30-40 minutes.

When using the cuvette with different than suggested volume, it is necessary to change proportionally the volumes of components mixture in the ratio:

Serum (distilled water): Reagent A: Reagent B: 0.4 M NaOH = 1:5:5:50

CALCULATIONS

Calculate the ALT activity by calibration curve.

CONSTRUCTION OF CALIBRATION CURVE

1. For construction of calibration curve prepare samples according to the table:

Solution	Samples numbers				
	1	2	3	4	5
Distilled water, ml	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Reagent S, ml	-	0,05	0,10	0,15	0,20
Reagent A, ml	0,50	0,45	0,40	0,35	0,30
Reagent B, ml	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
ALT activity, mmol/h x l	0	1	2	3	4

- Mix and incubate for 20 minutes at 18-25°C.
- Add in labeled tubes 5,0 ml of 0,4 M NaOH.
- Mix and incubate for 10 minutes at 18-25°C.
- Measure the absorbance of samples 2-5 relative to first sample. Wave-length is 500-550 nm.
- The ALT activity in samples corresponds to table.
- Construct the curve of absorbance depending on enzyme activity.
 1 mmol/h x l = 278 nmol/s x l = 16,7 IU/l

METROLOGICAL CHARACTERISTICS

Sensitivity limit: 0,36 mmol/h x l = 100 nmol/s x l.
 Linearity limit: 4,2 mmol/h x l = 1170 nmol/s x l. For higher values, dilute the sample with 3% solution of albumin in saline solution, and repeat measurement. Multiply the result by dilution coefficient.
 Reproducibility (run to run): variation factor < 7 %.

Interference:

Increased concentration of substances, containing ketogroups, cause false increase enzyme activity. Therefore, it is essential for diabetics to test blank sample, where pipette serum after adding Reagent C.

These metrological characteristics have been obtained using an analyzer. Results may vary if a different instrument or manual procedures are used.

DIAGNOSTIC CHARACTERISTICS

ALT is normally present in many tissues but the highest concentrations are found in liver and kidneys.

The serum concentration of ALT is elevated in hepatitis and other forms of liver disease associated with necrosis: infectious mononucleosis, cholestasis, cirrhosis, metastatic carcinoma of the liver delirium tremens, and after administration of various drugs, such as opiates, salicylates or ampicilin^{4,5}.

Clinical diagnosis should not be made on the findings of a single test result, but should integrate both clinical and laboratory data.

BIBLIOGRAPHY

- V.G. Kolb, V.S. Kamyshnikov. Clinical chemistry reference book., M, Medicine, 1986.
- Edition by V.V. Menshikov. Laboratory method for clinical assay. Handbook, M, Medicine, 1987.
- A.M. Goriachkovsky. Reference manual for clinical biochemistry. Odessa, OKFA, 1994.
- Friedman and Young, Effects of disease on clinical laboratory tests, 3rd ed. AACCC Press. 1987.
- Tietz NW, Clinical guide to laboratory tests, 2nd ed. Saunders co, 1991