

**ALT/SGPT
АЛАНИН АМИНОТРАНСФЕРАЗА
UV-КИНЕТИЧЕН МЕТОД****ЗА КОЛИЧЕСТВЕНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА АЛАНИН АМИНОТРАНСФЕРАЗА В СЕРУМ****ПРИНЦИП НА МЕТОДА**

ALT

L-Alanine + α -Ketoglutarate \rightarrow Pyruvate+L-Glutamate

LDH

Pyruvate + NADH+H⁺ \rightarrow Lactate+NAD⁺+H₂O

Пируватът образуван в първата реакция се редуцира до лактат в присъствието на лактат дехидрогеназа и NADH. Активността на ALT се определя чрез измерване на скоростта на оксидация на NADH при 340 nm. Ендогенният пируват в пробата се преобразува в лактат от LDH по време на лагфазата преди измерването.

РЕАГЕНТИ

Когато се приготви според указанията, реагентът съдържа:

α -Ketoglutarate	13 mM
L-Alanine	400 mM
NADH	0.2 mM
LDH	800 U/L
Buffer, pH 7.5	100 mM

Нереактивни стабилизатори и консерванти

ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ

Реагентите са само за "ин витро" употреба. Трябва да се спазват обичайните предпазни мерки за работа с лабораторни реагенти и да се избягва поглъщане или контакт с кожата и очите. Използвайте дестилирана или дейонизирана вода според инструкциите на опаковката.

СЪХРАНЕНИЕ И СТАБИЛНОСТ НА РЕАГЕНТИТЕ

Съхранявайте сухия реагент при 2-8°C. Разтвореният реагент е стабилен 30 дни при 2-8°C и 24 часа на стайна температура. Не използвайте реагента, ако има признаци на помътняване, което е знак за замърсяване или ако в съда е проникнала влага и са се образували бучки. Работният реагент трябва да бъде изхвърлен, ако сляпата проба при 340 nm е под 0.8 или ако реагентът не отговаря на посочените стойности за линейност и на контролните стойности.

СЪБИРАНЕ И СЪХРАНЕНИЕ НА ПРОБИТЕ

Тестът е предназначен за серум. Според литературата ALT е стабилен в серума поне седем дни при 4-8°C. Не трябва да се използват хемолизирани проби, тъй като еритроцитите съдържат седем пъти по-висока активност на ALT, отколкото в серума.

ИНТЕРФЕРИРАЩИ СУБСТАНЦИИ

Пиридоксалният фосфат може да причини повишени стойности на ALT, като активира апоензимната форма на трансаминазата. Пиридоксалният фосфат може да бъде открит във вода, заразена с микробен растеж. Високите нива на серумен пируват също могат да окажат интерфериращо въздействие. В литературата е посочен изчерпателен списък на медикаментите, които също интерферира с стойностите на ALT.

ПРОЦЕДУРА ЗА МАНУАЛНА РАБОТА

1. Разтворете реагента според инструкциите.
2. Нулирайте спектрофотометъра с дестилирана вода при 340 nm.
3. Пипетирайте 1.0 mL от реагента в 1 cm кювета и темперирайте при 37°C. Ако спектрофотометърът изисква крайно количество по-високо от 1.0 ml, използвайте Резервната процедура, за да постигнете точни отчитания.
4. Добавете 100 μ L (0.10mL) серум в съответната кювета, разбъркайте леко.
5. Върнете в термокуветата. След 60 секунди отчетете абсорбцията при 340 nm.
6. Отчетете абсорбцията още 2 пъти през интервал от 1 минута.
7. Изчислете средната абсорбция на минута ($\Delta A/min$), умножете по фактор 1768, за да получите резултатите в IU/L.

8. Проби със стойности над 500 IU/L трябва да се разреждат с физиологичен разтвор, да се изследват отново и крайният резултат да се умножи по 2.

Забележки: Ако кюветата не е термостатирана, инкубирайте пробите при 37°C между отчитанията.

Мътни или силно иктерични проби могат да дадат първоначална абсорбция надвишаваща обхвата на спектрофотометъра. За по-точни резултати използвайте 0.05 ml проба и умножете крайния резултат по 2.

ИЗЧИСЛЕНИЯ

$$ALT(IU/L) = \frac{\Delta Abs/min \times TV \times 1000}{\epsilon \times LP \times SV} = \frac{\Delta Abs/min \times 1.1 \times 1000}{6.22 \times 0.1 \times 1.0}$$

$$= \Delta Abs/min \times 1768$$

$\Delta Abs/min$ = средната разлика в абсорбцията на минута

TV = общия обем на реакцията (ml)

1000 = преизчисление на IU/ml в IU/L

ϵ = милимоларна абсорбтивност на NADH

LP = светлинен път (cm)

SV = обем на пробата (ml)

Пример: 1.480 – начална абсорбция 1.350 – абсорбция след 1 минута

$$\Delta Abs/min = 1.480 - 1.350 = 0.12 \text{ Тогава } 0.12 \times 1768 = 21.2 \text{ IU/L}$$

За да се конвертират резултатите в SI единици (nkat/L), умножете стойността в IU/L по 16.67

Забележка: Ако параметрите на теста се променят, факторът трябва да се преизчисли с горепосочената формула.

РЕЗЕРВНА ПРОЦЕДУРА

1. Разтворете реагента според инструкциите.
2. Пипетирайте 2.8 ml от реагента в 1 cm кювета и я оставете да се темперира при 37°C.
3. Добавете 0.20ml (200 μ l) от пробата към реагента. Разбъркайте леко.
4. Темперирайте при 37°C и след една минута отчетете абсорбцията при 340 nm. (A1)
5. След точно три минути отчетете и запишете абсорбцията (A2)
6. Изчислете разликата в абсорбцията между отчитанията A1-A2 и умножете по фактор 803.

ИЗЧИСЛЕНИЯ

$$(A1-A2) \times 3.0 \times 1000 = (A1 - A2) \times 803$$

$$3 \times 1 \times 6.22 \times 0.2$$

Където: A1 – A2 = разлика в абсорбцията

$$\text{Пример: } A1 = 1.45, A2 = 1.35, \text{ то } (1.45 - 1.35) \times 803 = 0.10 \times 803 = 80.3 \text{ IU/L}$$

Забележка: Ако параметрите на теста се променят, факторът трябва да се преизчисли с горепосочената формула.

ОГРАНИЧЕНИЯ

Реагентът е линеен до 500 IU/L. Проби със стойности на ALT над това ниво трябва да се разреждат 1:1 с физиологичен разтвор, да се изследват отново и резултатът да се умножи по 2.

ОЧАКВАНИ СТОЙНОСТИ

До 26 IU/L (30°C) До 38 IU/L (37°C)

Този обхват трябва да служи само като ориентир. Препоръчително е всяка лаборатория да установи свой обхват от очаквани стойности.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ТЕСТА

1. Линейност: 500 IU/L.
2. Сравнения: Изследване, сравняващо настоящия метод с подобен метод даде коефициент на корелация 0.99 и уравнение на регресията $y = 0.98x + 1.32$.
3. Точност:

	В серия		Между серии	
	Серум 1	Серум 2	Серум 1	Серум 2
Средна стойн.(IU/L)	23.6	82.6	23.4	82.4
Станд. откл.	1.8	2.1	1.9	1.9
C.V.(%)	7.9	2.5	8.0	2.3

REV: 01/04

Производител: Teco Diagnostics, 1268 N. Lakeview Avenue, Anaheim, CA 92807 USA Tel. 714 693 7788 Fax: 714 693 3838

Вносител: "ЕТГ" ЕООД, София 1504, ул. Тракия №15, офис 1