

«ПОГОДЖЕНО»

Перший заступник голови Державної
служби України з лікарських засобів
09 листопада 2012 р. **І.Б. Демченко**

REF №**HP015.02**

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Головний лікар клінічної лікарні „Феофанія”
Державного управління справами
30 жовтня 2012 р. **І.П. Семенів**

ТУ У 24.4-24607793-017-2003

**ІНСТРУКЦІЯ ДО НАБОРУ РЕАКТИВІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ
ІЗОФЕРМЕНТНИХ ФОРМ ЛАКТАТДЕГІДРОГЕНАЗИ ЛДГ₁, ЛДГ₂, ЯК
α-ГІДРОКСИБУТИРАТДЕГІДРОГЕНАЗИ (кінетичний УФ метод)**

ПРИЗНАЧЕННЯ**IVD**

Набір призначений для визначення активності ізоферментної форми лактатдегідрогенази (ЛДГ₁, ЛДГ₂) як α-гідроксибутиратдегідрогенази (α-ГБДГ) у сироватці крові людини в клініко-діагностичних, біохімічних лабораторіях та науково-дослідницькій практиці.

Набір розрахований на **20 макро-** або **80 мікрровизначень** при запуску реакції субстратом, або на **20 макро-** або **100 мікрровизначень** при запуску реакції зразком.

Лінійність методу повинна зберігатися до швидкості зміни оптичної щільності (ΔE/хв) 0,150 для хвиль Hg 334 нм, 340 нм або 0,070 для Hg 365 нм.

Коефіцієнт варіації визначення - не більше 7 %.

Припустима похибка визначення - не більше 20 %.

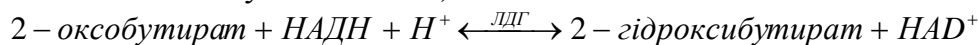
Зберігання набору - при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С.

Гарантійний термін придатності набору - 12 місяців від дня виготовлення.

Набір призначений для застосування *in vitro* професійно навченим лаборантом.

ПРИНЦИП МЕТОДУ

УФ метод, що базується на оптимізованому стандартному методі відповідно до вимог DGKC (Німецького Товариства Клінічної Хімії) і модифікований відповідно до рекомендацій SCE (Скандинавського комітету по ензимам).



НАДН та NAD⁺ - дві форми β-нікотінамід аденін дінуклеотиду.

2-Оксобутират перетворюється в 2-гідроксибутират з одночасним окислюванням НАДН. Швидкість зменшення абсорбції при 340 нм, зв'язана з окислюванням НАДН, прямо пропорційна активності α-ГБДГ (ЛДГ₁ і менше ЛДГ₂) у пробі.

СКЛАД НАБОРУ

- | | |
|---|--|
| 1. Буферний розчин α-ГБДГ (РЗ) | - 4 флакони по (20 ± 1) мл; |
| - ТРІС буфер рН (7,4 ± 0,2) (62,500 ± 3,125) ммоль/л; | |
| - 2-Оксобутират (3,750 ± 0,075) ммоль/л; | |
| - ЕДТО (6,250 ± 0,075) ммоль/л; | |
| 2. Стабілізуючий розчин | - 1 флакон з (20 ± 1) мл; |
| - гідроокис натрію 0,01 Н | |
| 3. Субстрат НАДН | - 1 мікропробірка з (16 ± 2) мг
або 1 таблетка у флаконі. |

КОНЦЕНТРАЦІЯ РЕАГЕНТІВ У ТЕСТІ

- | | |
|---------------------------|---------------------------|
| - ТРІС буфер рН (7,4±0,2) | (50,0 ± 2,5) ммоль/л; |
| - 2-Оксобутират | (3,00 ± 0,15) ммоль/л; |
| - ЕДТО | (5,00 ± 0,25) ммоль/л; |
| - НАДН | (0,1500 ± 0,0075) ммоль/л |

ЗРАЗОК

Сироватка, гепаринізована або ЕДТО-плазма.

Гемоліз неприпустимий. Зразки стабільні при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С протягом 24 годин.

ОБЛАДНАННЯ

1. Фотометричне обладнання, яке здатне вимірювати оптичну щільність розчинів при довжині хвилі **334** нм, **340** нм або **365** нм в діапазоні (0-1,0) од. опт. щільності та довжині оптичного шляху 10 мм.
2. Пробірки місткістю 10 мл (ГОСТ 1770-74).
3. Піпетки місткістю 0,1 і 5 мл (ГОСТ 29227-91).

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Для контролю ходу реакції та процедури вимірювання рекомендується використовувати контрольні сироватки із значеннями активності, визначеними даним методом. Наприклад: "ФілоНорм" або „ФілоПат" (Україна).

Кожна лабораторія повинна встановити власну внутрішню систему контролю якості.

ПРИГОТУВАННЯ РОБОЧИХ РОЗЧИНІВ

1. **РОЗЧИН СУБСТРАТУ (P2)** - Розчинити вміст мікропробірки з НАДН у флаконі із стабілізуючим розчином. За умови зберігання в темному місці і температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С розчин стійкий не менше одного місяця.
2. **ЗАПУСК РЕАКЦІЇ СУБСТРАТОМ.** Реактиви стабільні до закінчення терміну придатності і не менше місяця після відкриття флаконів за умови зберігання при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С. Буферний розчин необхідно зберігати у темному місці (світлочутливий).
3. **ЗАПУСК РЕАКЦІЇ ЗРАЗКОМ** - змішати 4 частини (P3) із 1 частиною (P2). Стабільність **Монореактиву (P3)+(P2):** 1 тиждень при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С; 1 доба при температурі від плюс 15 °С до плюс 25 °С і зберіганні в темному місці.

ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

При вимірюванні потрібно підтримувати постійну температуру ($\pm 0,5$ °С).

1 ЗАПУСК РЕАКЦІЇ СУБСТРАТОМ (ТАБЛИЦЯ 1)

Таблиця 1

Температура	плюс 25 °С чи плюс 30 °С		плюс 37 °С	
Піпетувати, мкл	макро	мікро	макро	мікро
Буферний розчин (P3)	4000	1000	4000	1000
Інкубувати 5 хв, потім додати				
Зразок	100	20	50	10
Перемішати, інкубувати 1 хв, потім додати				
Розчин субстрату (P2)	1000	250	1000	250

2 ЗАПУСК РЕАКЦІЇ ЗРАЗКОМ (ТАБЛИЦЯ 2)

Таблиця 2

Температура	плюс 25 °С чи плюс 30 °С		плюс 37 °С	
Піпетувати, мкл	макро	мікро	макро	мікро
Монореактив (P3)+(P2)	5000	1000	5000	1000
Інкубувати 5 хв, потім додати				
Зразок	100	20	50	10

В обох випадках перемішати, через 1 хв зчитувати змінення екстинції з інтервалом 1 хв (або через інші рівні проміжки часу) на протязі 3 хв по відношенню до **повітря або дистильованої води**. Розрахувати середнє змінення екстинції за 1 хв. ($\Delta E/xv$).

РОЗРАХУНОК

Для одержання активності в **МОд/л** множити $\Delta E/xv$ на **ЧИННИК**, зазначений у таблиці 3.

Таблиця 3

Запуск реакції субстратом	плюс 25 °С або 30 °С		плюс 37 °С	
Довжина хвилі, нм	макро	мікро	макро	мікро
340	8095	10080	16030	20000
334	8250	10275	16345	20390
365	15000	18675	29705	37060
Запуск реакції зразком	плюс 25 °С або 30 °С		плюс 37 °С	
Довжина хвилі, нм	макро або мікро		макро або мікро	
340	8095		16030	
334	8250		16345	
365	15000		29705	

Для одержання активності в мккат/л множити $\Delta E/xv$ на ЧИННИК, зазначений у таблиці 4.

Таблиця 4

Запуск реакції субстратом	плюс 25 °С або 30 °С		плюс 37 °С	
Довжина хвилі, нм	макро	мікро	макро	мікро
340	134,92	168,00	267,17	333,33
334	137,50	171,25	272,42	339,83
365	250,00	311,25	495,08	617,67
Запуск реакції зразком	плюс 25 °С або 30 °С		плюс 37 °С	
Довжина хвилі, нм	макро чи мікро		макро чи мікро	
340	134,92		267,17	
334	137,50		272,42	
365	250,00		495,08	

НОРМАЛЬНІ ВЕЛИЧИНИ (ДЛЯ ДОРОСЛИХ)

Температура	25 °С	30 °С	37 °С
МОД/л	55-140	65-165	72-182
Мккат/л	0,92-2,33	1,08-2,75	1,20-3,03

Дані величини орієнтовні, рекомендується визначення власних нормальних величин в кожній лабораторії.

ПАРАМЕТРИ ПРОГРАМУВАННЯ

Найменування набору реактивів	ЛДГ 1 (Кінетика)
Тип аналізатора (напівавтомат/автомат)	будь-який
Метод виміру	Кінетика
Зміна оптичної щільності	Зміншується
Довжина хвилі, нм	340
Вимір проти	повітря
Температура реакції, °С	37
Чинник	-16030
Концентрація стандарту	-
Співвідношення реагент/проба (мкл/мкл)	1000 : 10
Кількість вимірів, не менше	3
Час передінкубації, с	60
Час реакції, с	60
Одиниці виміру	МОд/л
Верхня межа абсорбції контрольної проби, А	2,00
Нижня межа абсорбції контрольної проби, А	1,00
Максимально допустиме $\Delta E/xv$, А	0,150
Межі лінійності	0-1200
Максимум норми	182
Мінімум норми	72
Підтвердження лінійності (так/ні)	так

ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Лактатдегідрогеназа присутня у всіх клітинах організму, але найбільш високий вміст спостерігається в печінці, серці, нирках, скелетній мускулатурі і еритроцитах.

α -Гідроксибутиратдегідрогеназа (α - НВДН) – це ізофермент лактатдегідрогенази (ЛДГ), який як додатковий субстрат використовує α -гідроксибутират.

Порівняно з іншими ізоферментами ЛДГ він більшою мірою присутній в серцевому м'язі і, отже, чутливіший і більш специфічний при діагностиці інфаркта міокарду.

Клінічний діагноз повинен встановлюватися на основі інтеграції клінічних і лабораторних даних.

ІНТЕРФЕРЕНЦІЯ

Ліпемія (тригліцериди < 2 г/л), аскорбінова кислота до 500 мг/л, глюкоза до 5 г/л та білірубін (< 500 мг/л) не впливають ⁵⁾. Гемоліз впливає на хід визначення.

На хід визначення можуть робити вплив деякі ліки і речовини. ⁶⁾

ЗАПОБІЖНИ ЗАХОДИ

1. При роботі використовувати гумові рукавички, заборонено їсти, пити, курити.
2. Реактиви містять азид натрію як протектор (отруйна речовина). НЕ КОВТАТИ! Уникати попадання на шкіру і слизові оболонки.

УТИЛІЗУВАННЯ

Всі зразки для аналізу вважають за матеріал, який може бути інфікований, і спільно з можливими залишками реактивів підлягає знищенню відповідно до затверджених внутрішньолікарняних правил.

Паперову упаковку здайте в макулатуру, виполоскану тару - в сортоване сміття.

ПРИМІТКИ

1. Можлива втрата активності ЛДГ при зберіганні протягом 3 діб: при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С - до 2 %; при температурі від плюс 15 °С до плюс 25 °С - до 8 %. Втрата активності ЛДГ₁ при зберіганні протягом 7 днів при температурі від плюс 2 °С до плюс 25 °С - до 5 %.
2. Якщо швидкість зміни оптичної щільності реакційного розчину вище обговорених меж лінійності (див. вище межа лінійності методу), 0,1 мл зразку розвести 0,9 мл 0,9 % розчином хлористого натрію. Отриманий результат помножити на 10.

ЛІТЕРАТУРА

1. Z.KLIN.CHEM.KLIN.BIOCHEM. 8 (1970) 658;
2. Z.KLIN.CHEM.KLIN.BIOCHEM. 10 (1972) 182;
3. Weisshaar D.et.al., MED.WELT 26 (1975) 387;
4. Witt,I. & Trendelenburg,C., Z.KLIN.CHEM.KLIN.BIOCHEM. 20 (1982) 235-242.
5. Ann. Biol. Clin. 1982; 40:123.
6. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Press, 1997.



CP 2216/2003
09.11.2012

 **ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика»**,

Україна, 49051 Дніпропетровськ, вул. Каштанова, 32

Тел./факс: (056) 747-47-76, 747-45-34

Тел.:(093) 573-75-35, (067) 535-15-73, (095) 168-36-54

E-mail: felicit_d@ua.fm <http://www.felicit.com.ua>