

«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-, 40 напівмікро- або 80 мікрОВИЗНАЧЕНЬ** при запуску реакції субстратом, або на **25 макро-, 50 напівмікро- або 100 мікрОВИЗНАЧЕНЬ** при запуску реакції зразком (Див. *Примітку 3*).

Лінійність методу повинна зберігатися до швидкості зміни оптичної щільності ($\Delta E/xv$) 0,150 для хвиль Нg 334 нм, 340 нм або 0,070 для Нg 365 нм.

Коефіцієнт варіації визначення - не більше 7 %.

Припустима похибка визначення - не більше 20 %.

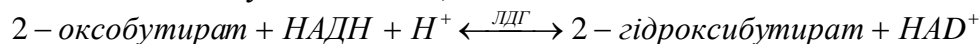
Зберігання набору - при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С.

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	<i>напівмікро</i>	мікро	макро	<i>напівмікро</i>	мікро
Буферний розчин (P3)	4000	<i>2000</i>	1000	4000	<i>2000</i>	1000
Інкубувати 5 хв, потім додати						
Зразок	100	<i>50</i>	20	50	<i>25</i>	10
Перемішати, інкубувати 1 хв, потім додати						
Розчин субстрату (P2)	1000	<i>500</i>	250	1000	<i>500</i>	250

2 ЗАПУСК РЕАКЦІЇ ЗРАЗКОМ (ТАБЛИЦЯ 2)

Таблиця 2

Температура	плюс 25 °С чи плюс 30 °С			плюс 37 °С		
Піпетувати, мкл	макро	<i>напівмікро</i>	мікро	макро	<i>напівмікро</i>	мікро
Монореактив (P3)+(P2)	4000	<i>2000</i>	1000	4000	<i>2000</i>	1000
Інкубувати 5 хв, потім додати						
Зразок	80	<i>40</i>	20	40	<i>20</i>	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 або напівмікро	мікро	Макро або напівмікро	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, напівмікро або мікро		Макро, напівмікро 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 або напівмікро	мікро	макро або напівмікро	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, напівмікро чи мікро		Макро, напівмікро 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

ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

α -Гідроксибутиратдегідрогеназа (α -HBDH) – 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 впливають⁵⁾. 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.
3. Розраховано при витраті розчинів реагентів 1,25 мл (мікро-), 2,5 мл (напівмікро-), 5,0 мл (макро-) при запуску реакції субстратом, або 1,0 мл (мікро-), 2,0 мл (напівмікро-), 4,0 мл (макро-) при запуску реакції зразком

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.

(Effects of drugs on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Press, 1997.

FELICIT



ТОВ НВП «Фелісіт-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>