

«ПОГОДЖЕНО»

Перший заступник голови Державної
служби України з лікарських засобів

09 листопада 2012 р.

І.Б. Демченко

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Головний лікар клінічної лікарні „Феофанія”
Державного управління справами

30 жовтня 2012 р.

І.П. Семенів

КОД ЗА НК 024:2023 – 61416

REF №НР015.02

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 (ΔЕ/хв) 0,150 для хвиль Нг 334 нм, 340 нм або 0,070 для Нг 365 нм.

Коефіцієнт варіації визначення - не більше 7 %.

Припустима похибка визначення - не більше 20 %.

Чутливість ⁷ на 0,001 од. оптичної щільності – не більше 35 МОд/л (365 нм).

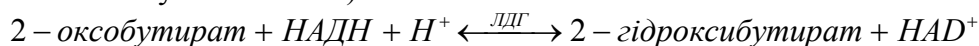
Зберігання набору - при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С.

Гарантійний термін придатності набору - 12 місяців від дня виготовлення.

Набір призначений для застосування *in vitro* тільки кваліфікованим лабораторним персоналом.

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 енізмам).



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

- 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;
- Стабілізуючий розчин - 1 флакон з (20 ± 1) мл;
 - гідроокис натрію 0,01 Н
- 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 (**Можливо використання автоматичного аналізатора. Інструкція для автоматичного аналізатора висилається за замовленням споживача**).
2. Пробірки місткістю 10 мл (згідно з чинними нормативними документами).
3. Піпетки місткістю 0,1 та 5 мл (ДСТУ EN ISO 835:2018).
4. Автоматична водяна баня або термостат, що підтримують температуру плюс $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$, плюс $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ або плюс $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

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

Якщо значення контролю виходять за межі встановленого діапазону, перевірте обладнання, реактиви та можливі технічні проблеми.

Кожна лабораторія повинна встановити власну внутрішню систему контролю якості та коригуючі дії, якщо контроль не відповідає допустимим нормам.

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 $2 ^\circ\text{C}$ до плюс $8 ^\circ\text{C}$ розчин стійкий **1 тиждень**.
2. **ЗАПУСК РЕАКЦІЇ СУБСТРАТОМ**. Реактиви стабільні до закінчення терміну придатності і не менше місяця після відкриття флаконів за умови зберігання при температурі від плюс $2 ^\circ\text{C}$ до плюс $8 ^\circ\text{C}$. 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 $2 ^\circ\text{C}$ до плюс $8 ^\circ\text{C}$; 1 доба при температурі від плюс $15 ^\circ\text{C}$ до плюс $25 ^\circ\text{C}$ і зберіганні в темному місці.

ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

При вимірюванні потрібно підтримувати постійну температуру ($\pm 0,5 ^\circ\text{C}$).

1 ЗАПУСК РЕАКЦІЇ СУБСТРАТОМ (ТАБЛИЦЯ 1)

Таблиця 1

Температура	плюс $25 ^\circ\text{C}$ чи плюс $30 ^\circ\text{C}$			плюс $37 ^\circ\text{C}$		
Піпетувати, мкл	макро	напівмікро	мікро	макро	напівмікро	мікро
Буферний розчин (P3)	4000	2000	1000	4000	2000	1000
Інкубувати 5 хв, потім додати						
Зразок	100	50	20	50	25	10
Перемішати, інкубувати 1 хв, потім додати						
Розчин субстрату (P2)	1000	500	250	1000	500	250

2 ЗАПУСК РЕАКЦІЇ ЗРАЗКОМ (ТАБЛИЦЯ 2)

Таблиця 2

Температура	плюс $25 ^\circ\text{C}$ чи плюс $30 ^\circ\text{C}$			плюс $37 ^\circ\text{C}$		
Піпетувати, мкл	макро	напівмікро	мікро	макро	напівмікро	мікро
Монореактив (P3)+(P2)	4000	2000	1000	4000	2000	1000
Інкубувати 5 хв, потім додати						
Зразок	80	40	20	40	20	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. ($\Delta E/\text{хв}$).

РОЗРАХУНОК

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

Таблиця 3

Запуск реакції субстратом	плюс 25 °C або 30 °C		плюс 37 °C	
Довжина хвилі, нм	Макро або <i>напівмікро</i>	мікро	Макро або <i>напівмікро</i>	мікро
340	8095	10080	16030	20000
334	8250	10275	16345	20390
365	15000	18675	29705	37060
Запуск реакції зразком	плюс 25 °C або 30 °C		плюс 37 °C	
Довжина хвилі, нм	Макро , <i>напівмікро</i> або мікро		Макро , <i>напівмікро</i> або мікро	
340	8095		16030	
334	8250		16345	
365	15000		29705	

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

Таблиця 4

Запуск реакції субстратом	плюс 25 °C або 30 °C		плюс 37 °C	
Довжина хвилі, нм	макро або <i>напівмікро</i>	мікро	макро або <i>напівмікро</i>	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 °C або 30 °C		плюс 37 °C	
Довжина хвилі, нм	макро , <i>напівмікро</i> чи мікро		Макро , <i>напівмікро</i> чи мікро	
340	134,92		267,17	
334	137,50		272,42	
365	250,00		495,08	

ПАРАМЕТРИ ПРОГРАМУВАННЯ

Найменування набору реактивів	ЛДГ 1 (Кінетика)
Тип аналізатора (напівавтомат/автомат)	будь-який
Метод виміру	Кінетика
Зміна оптичної щільності	Зменшується
Довжина хвилі, нм	340
Вимір проти	повітря
Температура реакції, °C	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 $\Delta E/\text{хв}$, А	0,150
Межі лінійності	0-2400
Максимум норми	182
Мінімум норми	72
Підтвердження лінійності (так/ні)	так

НОРМАЛЬНІ ВЕЛИЧИНИ (ДЛЯ ДОРОСЛИХ)

Температура	25 °C	30 °C	37 °C
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, відповідно до правил GLP (Належної Лабораторної Практики) рекомендується визначення власних нормальних величин в кожній лабораторії, характерних для обстежуваного контингенту.

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.

Він, порівняно з іншими ізоферментами ЛДГ, 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 впливати 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.

УТИЛІЗАЦІЯ

Всі зразки для аналізу вважають за матеріал, який може бути інфікований, і разом 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 °C до плюс 8 °C - до 2 %; при температурі від плюс 15 °C до плюс 25 °C - до 8 %. Втрата активності ЛДГ₁ при зберіганні протягом 7 днів при температурі від плюс 2 °C до плюс 25 °C - 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.
6. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Press, 1997.
7. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997).



ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика»,

Україна, 49051 м. Дніпро, 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: filicit@ukr.net <http://www.felicit.com.ua>

FELICIT