

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 201__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

201__ г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для определения активности
лактатдегидрогеназы в сыворотке и плазме крови кинетическим УФ-методом
(ЛДГ-УФ-Ново)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов ЛДГ-УФ-Ново предназначен для определения активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке и плазме крови человека кинетическим УФ-методом. Набор может быть использован в клинико-диагностических, биохимических лабораториях и научно-исследовательской практике.

1.2. Набор производится в лиофилизированной (варианты 1 и 2) и жидкой (варианты 3, 4 и 5 авто) формах.

Набор рассчитан, в зависимости от варианта комплектации, на проведение 80 (вариант 1), 100 (варианты 2 и 3) или 200 (вариант 4) определений при расходе 1,0 мл рабочего раствора реагентов на одно определение. Вариант 5 авто предназначен для проведения анализа на автоматических биохимических анализаторах, объём компонентов и их расфасовка определяется вместимостью картриджей для данной модели анализатора.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на восстановлении пирувата в лактат под действием ЛДГ. Одновременно происходит окисление эквимольного количества β -никотинамидадениндинуклеотида, в результате чего происходит уменьшение оптической плотности при длине волны 340 нм. Скорость уменьшения оптической плотности прямопропорционально активности ЛДГ.

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: нач. отдела биохимии, к.б.н. Л.В. Гаевой и нач. участка Е.А. Курбатовой.

ЭЛЕКТРОННАЯ КОПИЯ ОФОРМЛЕНА ЦЕНТРОМ ИСПЫТАНИЙ И РЕГИСТРАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

– реагент 1: буферный раствор, содержащий трис, 0,07 моль/л; пируват натрия, 1,6 ммоль/л; натрий хлористый, 0,2 моль/л; натрия азид, 0,05%; pH $7,4 \pm 0,1$ – 4 флакона (по 20 мл) (вариант 1) или 2 флакона (по 50 мл) (вариант 2);

– реагент 1: буферный раствор, содержащий трис, 0,07 моль/л; пируват натрия, 2,0 ммоль/л; натрий хлористый, 0,25 моль/л; натрия азид, 0,05%; pH $7,4 \pm 0,1$ – 4 флакона (по 20 мл) (вариант 3); 2 флакона (по 80 мл) (вариант 4) или 1-4 картриджа (вариант 5 *авто*).

– реагент 2: β -NADH, 4,8 мкмоль; трис, 0,088 ммоль – 4 флакона (лиофилизированная смесь) (вариант 1);

– реагент 2: β -NADH, 12 мкмоль; трис, 0,088 ммоль – 2 флакона (лиофилизированная смесь) (вариант 2);

– реагент 2: раствор, содержащий натрий углекислый, 5 ммоль/л; калий углекислый, 5 ммоль/л; β -NADH, 1,2 ммоль/л; натрия азид, 0,05%; pH $10,5 \pm 0,1$ – 4 флакона (по 5,0 мл) (вариант 3); 2 флакона (по 20 мл) (вариант 4) или 1-4 картриджа (вариант 5 *авто*).

Для варианта 5 *авто* объём картриджей в наборе определяется моделью анализатора.

Конечные концентрации компонентов в рабочем растворе реагентов:

- β -NADH – 0,24 ммоль/л;
- пируват натрия – 1,6 ммоль/л;
- натрий хлористый – 0,2 моль/л;
- натрия азид – 0,05%;
- трис-буфер, pH 7,4 – 0,07 моль/л.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Концентрация аскорбиновой кислоты до 160 мг/л, билирубина – до 20 мг/л, триглицеридов – до 1000 мг/л, глюкозы – до 500 мг/л не влияют на точность анализа.

3.2. Линейность. Линейная область определения активности лактатдегидрогеназы – в диапазоне от 90 до 1055 Е/л. Отклонение от «линейности» – не более 5%.

3.3. Чувствительность определения – не более 75 Е/л.

3.4. Коэффициент вариации результатов определений – не более 5%.

3.5. Нормальные величины активности лактатдегидрогеназы в сыворотке и плазме крови от 195 до 450 Е/л.

3.6. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить диапазон нормальных величин активности ЛДГ для обследуемого контингента людей.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1.

4.2. Реагент 1 и реагент 2 (варианты 3, 4 и 5 *авто*) содержат токсичное соединение – азид натрия. При работе с этими реагентами и рабочим раствором реагентов следует избегать их разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания указанных растворов на кожу и слизистые необходимо промыть поражённые участки большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с исследуемыми образцами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом. Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 февраля 1991 г.

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатитов или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- Полуавтоматический или автоматический биохимический анализатор (длина волны 340 нм, термостатируемая кювета с длиной оптического пути 10 мм);
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 25 и 1000 мкл;
- пробирки стеклянные вместимостью 5,0-10 мл;
- термостат, поддерживающий температуру $+37 \pm 0,5$ °C;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- секундомер;
- вода дистиллированная;
- физиологический раствор (0,9 % NaCl).

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для проведения анализа следует использовать свежую сыворотку или гепаринизированную плазму крови без следов гемолиза.

Образцы сыворотки и плазмы крови можно хранить при комнатной температуре (+18-25 °C) не более 3 сут. Охлаждение или замораживание образцов не допустимо!

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Приготовление рабочего раствора реагентов.

7.1.1. Содержимое одного флакона с реагентом 2 растворить в содержимом одного флакона с реагентом 1 при перемешивании вручную, закрыв флакон той же пробкой (варианты 1 и 2).

7.1.2. Содержимое одного флакона с реагентом 1 объединить с содержимым одного флакона с реагентом 2, перемешать вручную (варианты 3 и 4).

Приготовленный рабочий раствор реагентов можно хранить в плотно закрытом виде при температуре +2-8 °С не более 1 мес.

7.2. Перед началом работы кювету полуавтоматического или автоматического биохимического анализатора и рабочий раствор реагентов нагреть до температуры +37±0,5 °С. При измерении оптической плотности постоянно поддерживать температуру +37±0,2 °С.

7.3. Проведение анализа на полуавтоматическом биохимическом анализаторе.

Внести в термостатируемую кювету полуавтоматического биохимического анализатора, поддерживающую температуру +37±0,2 °С, 1000 мкл подогретого рабочего раствора реагентов, добавить 25 мкл анализируемой сыворотки или плазмы крови, тщательно перемешать и включить секундомер.

Примечание. В зависимости от объема используемой кюветы количество рабочего раствора реагентов и анализируемого образца может быть пропорционально изменено (соотношение образца к рабочему раствору реагентов составляет 1:40).

7.3.1. Через 30 сек измерить оптическую плотность анализируемой пробы при длине волны 340 нм против воздуха. Повторить измерения 3 раза с интервалом времени 1 мин.

7.3.2. Рассчитать изменение оптической плотности анализируемой пробы за 1 мин (ΔE /мин) по формуле:

$$\Delta E / \text{мин} = \Delta E_n / t,$$

где: ΔE_n – изменение оптической плотности пробы, ед. опт. плотн.;

t – интервал времени между измерениями, мин.

Активность ЛДГ (А), Е/л, в анализируемом образце определить по формуле:

$$A = (\overline{\Delta E} / \text{мин}) \times F,$$

где: $\overline{\Delta E} / \text{мин}$ – среднее арифметическое значение изменения оптической плотности анализируемой пробы за 1 мин, ед. опт. плотн./мин;

Фактор пересчета (F) определяется по формуле:

$$F = (V \times 1000) / (\varepsilon \times v \times \ell) = (1,025 \times 1000) / (22 \times 0,025 \times 1) = 6592,$$

где: V – конечный объем реагентов в кювете, мл;

v – объем анализируемой пробы, мл;

ϵ – коэффициент молярной экстинкции β -NADH ($6,22 \text{ л} \times \text{моль}^{-1} \times \text{см}^{-1}$);

ℓ – длина оптического пути, см;

1000 – коэффициент пересчета для выражения активности ЛДГ в Е/л.

Примечание. 1 Е/л = 16,67 нмоль / (л×с).

7.4. Проведение анализа на автоматическом биохимическом анализаторе.

Проведение анализа на автоматическом биохимическом анализаторе проводить по соответствующим загрузочным листам, предоставленным предприятием-изготовителем набора, согласно инструкции по применению.

Определение активности лактатдегидрогеназы провести на автоматическом биохимическом анализаторе, используя основные параметры:

Длина волны в диапазоне	340 нм
Измерение против	Воздуха или воды
Метод измерения	Кинетика
Единица измерения	Е/л
Число знаков после запятой	0
Изменение оптической плотности	Уменьшается
Температура	+ 37±0,2 °С
Соотношение образец : рабочий раствор реагентов	1 : 40
Время инкубации (задержка)	30 с
Время реакции (считывания)	60-180 с
Число считываний	≥ 3
Верхний предел абсорбции реагента против воды	1,9 А
Нижний предел абсорбции реагента против воды	1,2 А
Максимально допустимое изменение оптической плотности/мин	0,16 А
Фактор	6592
Линейность	от 90 до 1055 Е/л

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов ЛДГ-УФ-Ново должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности (18 мес). Допускается хранение набора при температуре до +25 °С не более 10 сут.

8.2. Рабочий раствор реагентов можно хранить в плотно закрытом виде при температуре +2-8 °С не более 1 мес.

8.3. Для проведения анализа следует использовать свежую сыворотку или гепаринированную плазму крови без следов гемолиза.

8.4. Образцы сыворотки и плазмы крови можно хранить при комнатной температуре +18-25 °С) не более 3 сут. Охлаждение или замораживание образцов не допустимо!

8.5. Качество набора может проверяться по отечественным и зарубежным контрольным сывороткам, аттестованным данным методом, например: сыворотка контрольная - новый уровень 1), ЗАО «Вектор-Бест», Россия, кат. № В-8213, В-8214, РУ № ФСР 2008/02503 от 17.04.2008; сыворотка контрольная - новый (уровень 2), ЗАО «Вектор-Бест», Россия, кат. № В-3216, В-8217, РУ № ФСР 2008/02503 от 17.04.2008; контрольная сыворотка Contronorm Plus, Analyticon, Германия, кат. № 1205, РУ ФСЗ 2009/05322 от 23.10.2009; контрольная сыворотка ControPath Plus, Analyticon, Германия, кат. № 1305, РУ ФСЗ 2009/05322 от 23.10.2009.

8.6. Если величина активности ЛДГ в анализируемых образцах сыворотки и плазмы крови превышает 1055 Е/л, образец следует дополнительно развести физиологическим раствором в 10 раз (20 мкл исследуемого образца + 180 мкл физиологического раствора), повторить анализ и полученный результат умножить на 10.

8.7. Для отбора и добавления анализируемых проб и компонентов набора рекомендуется использовать полуавтоматические пипетки со сменными наконечниками, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования.

8.8. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества набора ЛДГ-УФ-Ново, следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 227-67-64, 227-75-50, тел./факс (383) 363-13-46

Начальник участка
ЗАО «Вектор-Бест»

Курб

Е.А. Курбатова

Начальник отдела биохимии
ЗАО «Вектор-Бест»

Гаева

Л.В. Гаева

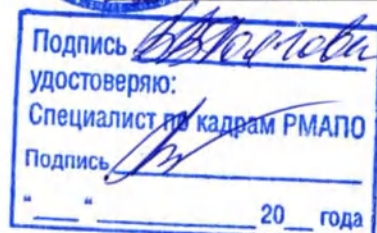
«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики
ГБОУ ДПО РМАПО

Минздравсоцразвития России
м.п.



д.м.н., профессор В.В. Долгов
«21.11» 2012 г.



Прошнуровано, пронумеровано
и скреплено печатью
6
Лист

Handwritten signature

