

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ (КАТ.№№ В-12501, В-12502, В-12503)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для фотометрического определения активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке и плазме крови в научных исследованиях. Набор рассчитан на 50, 125 и 500 определений при конечном объёме реакционной смеси 1 мл.

ПРИНЦИП МЕТОДА

ЛДГ катализирует реакцию восстановления пирувата в лактат с одновременным окислением НАДН в НАД⁺. Скорость уменьшения концентрации НАДН прямо пропорциональна активности ЛДГ.

СОСТАВ НАБОРА

Реагент 1 (Р1). Буферный раствор: имидазол-НСl, 250 ммоль/л, пируват, 2,25 ммоль/л; рН 7,4

Реагент 2 (Р2). НАДН, 0,18 ммоль/л.

Кат.№ Фасовка

В-12501 Р1 1х40 мл + Р2 1х10 мл

В-12502 Р1 5х20 мл + Р2 1х25 мл

В-12503 Р1 5х80 мл + Р2 1х100 мл

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность – не более 150 Е/л или 2,5 мккат/л.

Линейность – от 150 до 1500 Е/л (от 2,5 до 25 мккат/л) с отклонением не более 5%.

Коэффициент вариации – не более 5%.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Во избежание возможного инфицирования при работе с образцами крови необходимо надевать одноразовые резиновые перчатки.

При использовании набора следует соблюдать правила техники безопасности при работе с химическими веществами.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Анализаторы открытого типа различных изготовителей, дозаторы, позволяющие отбирать объём 0,01 мл, 0,2-1,0 мл, термостат, секундомер.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Сыворотка или гепаринизированная плазма, свободные от гемолиза и липемии.

ЛДГ в сыворотке и плазме крови стабильна при 18-25°С не более 3 дней. Хранение сыворотки при температуре ниже 4°С недопустимо. Гемолиз, даже очень незначительный вызывает резкое завышение активности ЛДГ [1].

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

Приготовление монореагента для схемы 1

Смешать необходимые количества реагентов 1 и 2 в соотношении 4:1. Полученный монореагент стабилен при температуре 2-8°С в течение 3 суток.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Длина волны 340 нм.

Кювета с длиной оптического пути 10 мм.

Температура проведения реакции 37°С.

Схема 1. Запуск реакции образцом

Раствор	Опытная проба
Монореагент, мл	1,0
Образец, мл	0,01

Инкубировать 5 мин. при температуре 37°С.

Пробы тщательно перемешать. Через 60 с измерить оптическую плотность опытной пробы (E₁). Через 60 с повторить измерение (E₂).

Рассчитать изменение оптической плотности за минуту (E₁ - E₂).

Схема 2. Запуск реакции реагентом 2

Раствор	Опытная проба
Реагент 1, мл	0,8
Образец, мл	0,01
Реагент 2, мл	0,2

Перемешать, инкубировать 5 мин. при температуре 37°С.

Пробы тщательно перемешать. Через 60 с измерить оптическую плотность опытной пробы (E₁). Через 60 с повторить измерение (E₂).

Рассчитать изменение оптической плотности за минуту (E₁ - E₂).

Примечание. Если вносится 1 мл реагента 1, то объём образца следует увеличить до 0,125 мл, а объём реагента 2 до 0,25 мл.

РАСЧЁТ

Активность **A** лактатдегидрогеназы рассчитать по формуле:

$$A = K \cdot (E_1 - E_2),$$

где **K** = -16030 Е/л.

ПРИМЕЧАНИЕ

Если активность ЛДГ выше 1500 Е/л (25 мккат/л) образец развести физраствором в 10 раз, анализ повторить, величину рассчитанной активности умножить на 10.

ПАРАМЕТРЫ ДЛЯ БИОХИМИЧЕСКИХ АНАЛИЗАТОРОВ

Тип анализатора	Любой
Метод измерения	Кинетика
Длина волны, нм	340
Измерение против	Воздуха или дистилл. воды
Температура реакции	37°C
Единица измерения	Е/л
Число знаков после запятой	0
Изменение оптической плотности	Уменьшается
Фактор	-16030*
Соотношение реагент/проба	100:1
Количество измерений, не менее	3
Время преинкубации, сек	60
Время реакции, сек	60
Верхний предел абсорбции реагента против воды, E	2,0
Нижний предел абсорбции реагента против воды, E	0,8
Предел максимальной абсорбции ΔE/мин.	0,094
Границы линейности, E/л	150-1500
Максимум нормы, E/л	450
Минимум нормы, E/л	225

*Для каждого анализатора следует уточнить фактор пересчёта по контрольным сывороточным калибраторам, аттестованным данным методом. Значение фактора может различаться в связи с различиями в технологии производства оптических систем анализаторов.

В случае возникновения каких-либо трудностей можно запросить адаптированную инструкцию по работе с набором «КлиниТест-ЛДГ».

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор должен храниться при температуре 2-8°C в упаковке предприятия-изготовителя в течение всего срока годности (12 месяцев). Реагенты после вскрытия флаконов можно хранить при температуре 2-8°C в течение всего срока годности набора.

НОРМАЛЬНЫЕ ВЕЛИЧИНЫ

Справочно.

Сыворотка человека

Е/л от 225 до 450

мккат/л от 3,75 до 7,5

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Контроль качества может быть проведён по контрольным сывороткам, аттестованным данным методом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Обеспечение качества лабораторных исследований. Преаналитический этап. Под ред. В.В. Меньшикова, М., 1999, "Лабинформ", с. 171-173.