

## Przeznaczenie

Do ilościowego oznaczania kinetyki *in vitro* aktywności dehydrogenazy mleczanowej w surowicy przy użyciu analizatorów Yumizen C230 i Yumizen C240.

Rx Only.

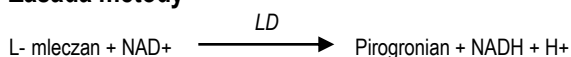
## Znaczenie kliniczne

Podwyższone poziomy LD są związane z zawałem mięśnia sercowego. Poziomy osiągają maksimum około 48 godzin po wystąpieniu bólu i utrzymują się przez około dziesięć dni. Stopień wznieśnienia ma znaczenie przy ocenie rozmiaru uszkodzeń i opracowywaniu prognozy. Podwyższony poziom LD obserwuje się również w chorobach wątroby, niedokrwistości złośliwej, w niektórych przypadkach chorób nerek oraz w niektórych przypadkach urazów mięśni szkieletowych.<sup>1</sup>

## Metoda

Wróblewski i Ladue<sup>2</sup> opublikowali pierwszą kinetyczną metodę UV do oznaczania aktywności LDH w surowicy w 1955 roku. Ich metoda opierała się na klasycznym teście Kubowitzki i Ott<sup>3</sup> (1943) wykorzystującym reakcję pirogronianu do mleczanu. W 1956 roku Wacker i wsp.<sup>4</sup> opisali procedurę, która następowała po reakcji mleczanu w pirogronian. Reakcja mleczanu do pirogronianu stała się preferowaną reakcją<sup>5</sup>, chociaż wolniejszą z dwóch, ze względu na szerszy zakres liniowy<sup>6</sup> i brak wymogu wstępnej inkubacji<sup>7</sup>. Niniejsza metoda podąża za reakcją do przodu i została zoptymalizowana pod kątem większej czułości i liniowości, jak opisali Gay i in.<sup>8</sup>

## Zasada metody



Dehydrogenaza mleczanowa katalizuje utlenianie mleczanu do pirogronianu z jednoczesną redukcją NAD do NADH. Szybkość redukcji NAD można zmierzyć jako wzrost absorpcji przy 340 nm. Szybkość ta jest wprost proporcjonalna do aktywności LD w surowicy.

## Skład odczynników

Po połączeniu R1 i R2 odczynnik zawiera: NAD 5,8 mM, L-mleczan 55 mM, Bufor pH 8,95. Niereaktywne stabilizatory i azydek sodu (0,1%) jako środek konserwujący.

## Przygotowanie odczynnika

Odczynniki dostarczane są w postaci gotowych do użycia płynów.

## Przechowywanie oraz stabilność odczynnika

Odczynniki są stabilne do podanego terminu ważności, jeśli są przechowywane zgodnie z zaleceniami. Chronić przed światłem. Unikać zanieczyszczenia mikrobiologicznego.

## Środki ostrożności

- Ten odczynnik jest przeznaczony wyłącznie do diagnostyki *in vitro*.
- Odczynniki zawierają jako środek konserwujący azydek sodu (0,1%). Nie spożywać. Unikać kontaktu ze skórą i oczami. Azydek sodu może wchodzić w reakcje z ołowianymi i miedzianymi armaturami instalacyjnymi, powodując wybuchowe azydki metali. Podczas usuwania odczynnika splukać dużą ilością wody.
- Ze wszystkimi próbkami i kontrolami należy obchodzić się zgodnie z dobrymi praktykami laboratoryjnymi, stosując odpowiednie środki ostrożności opisane w podręczniku CDC/NIH „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories”, wyd. 2, 1988, publikacja HHS nr (CDC) 88-8395.

## Pobieranie i przechowywanie próbek

- Zalecana jest surowica niezhemolizowana. Krwinki czerwone zawierają duże stężenia LD.<sup>5</sup>
- Surowicę należy niezwłocznie usunąć ze skrzepu.
- Próbki należy zbadać wkrótce po pobraniu. LD w surowicy jest stabilne przez dwa do trzech dni w temperaturze pokojowej.<sup>9</sup>
- Nie zamrażać ani nie wystawiać surowicy na działanie wysokich temperatur (37°C), ponieważ może to spowodować inaktywację termolabilnych izoenzymów LD.<sup>10</sup>
- Pobieranie próbek powinno odbywać się zgodnie z NCCLS M29-T2.<sup>11</sup> Żadna metoda nie daje całkowitej pewności, że próbki krwi ludzkiej nie przeniosą zakażenia. Dlatego wszystkie próbki należy traktować jako potencjalnie zakażne.

## Interferencje

- Niektóre leki i substancje wpływają na aktywność LD. Patrz Young i wsp.<sup>12</sup>
- Stwierdzono, że bilirubina do poziomu 20 mg/dl wykazuje znikomą interferencję ( $\leq 5\%$ ) w tym teście.
- Wykazano, że hemoliza znacząco zakłóca test przy poziomach tak niskich jak 100 mg/dl.

## Materiały zapewnione

Odczynnik Bufor Dehydrogenazy Mleczanowej (R1) Odczynnik Koenzym Dehydrogenazy Mleczanowej (R2)

## Materiały wymagane ale niedostarczane

- Analizator Yumizen C230 / Yumizen C240
- Instrukcja obsługi Yumizen C230 / Yumizen C240
- Kontrola Pointe Chemistry, numer katalogowy C7592-100

## Parametry testu

Test:	LDH	Nazwa chem.: Lactate Dehydrogenase
Numer	223	Wydruk: LDH
Typ reakcji:	Kinetyczna	Kierunek reakcji: Rosnąca
Di. Fali I:	340 nm	Di. Fali II: 405 nm
Miejsca dziesiętne:	0	Typ próbki: Surowica
Ślepa próba:		Cykl reakcji: 3 11
Jednostka:	U/L	Cykl inkubacji: 3

	Obj. próbki	Aspiracja	Rozcieńczalnik	Obj. odczynnika	Rozcieńczalnik
Prawidłowa:	11	uL	uL	180	uL
Zmniejszona:		uL	uL	45	uL
Zwiększona:		uL	uL		

Zakres liniowości (Prawidłowy):	0-1000	Limit liniowości:	0.3
Zakres liniowości (Zmniejszony):		Zużycie substratu:	25000
Zakres liniowości (Zwiększony):		Mieszana abs. próby ślepej:	- 40000 40000
Abs. R1/próba ślepa:	- 40000 40000	Stabilność na pokładzie:	30 Dni
Próba ślepa	- 40000 40000	Limit alarmu odczynnika:	5
Chemia bliźniacza:			

Efekt Prozone:

Q1:	Q2:	Q3:
Q4:	PC:	ABS:

Użyj wyniku jakościowego:

Zakres:	Flagi:
Przesunięcie i nachylenie	
Przesunięcie 1	Nachylenie 0
	Jednostka U/L

Przygotowanie:

Objętość próbki:	uL	Objętość odczynnika:	uL
------------------	----	----------------------	----

Zakres referencyjny:

Typ próbki: Płeć: Zakres dla wieku: Zakres ref.: Wartości krytyczne: Jednostka:

# Pointe Liquid Lactate Dehydrogenase Reagent Set

## Parametry kalibracji

Chem:	LDH			
Ustawienia kalibracji		Kalibrator	Steżenie	Poz
Model mat: K Factor		Woda	0.0	W
Factor: 3907.000	Powtórzenia: 2			
Akceptowalne limity				
Ważność kalibracji: 24 godz.				
Różnica nachylenia: SD:				
Czułość:	Powtarzalność:	* Zdefiniowane przez użytkownika		
Współczynnik determinacji:				
Automatyczna kalibracja				
<input type="checkbox"/> Po upływie ważności kalib.				

## Ograniczenia

- Zhemolizowana surowica spowoduje fałszywie podwyższone poziomy LD w surowicy.
- Próbki przekraczające granicę liniowości (1000 U/L) należy rozcieńczyć taką samą objętością soli fizjologicznej i ponownie zbadać. Pomnóż wyniki przez dwa, aby zrekomensować rozcieńczenie.

## Kalibracja

Procedura jest standaryzowana za pomocą milimolowej absorpcji NADH, przyjętej jako 6,22 przy 340 nm w opisanych warunkach testowych.

## Kontrola jakości

Ważność reakcji należy monitorować za pomocą próbek kontrolnych o znanych prawidłowych i nieprawidłowych wartościach LD. Kontrole te należy przeprowadzać co najmniej na każdej zmianie roboczej, podczas której wykonywane są testy LD. Zaleca się, aby każde laboratorium ustaliło własną częstotliwość oznaczania kontroli. Kontrolę jakości należy przeprowadzać zgodnie z lokalnymi, stanowymi i/lub federalnymi przepisami lub wymaganiami dotyczącymi akredytacji.

## Obliczenia (przykład)

Jedna jednostka międzynarodowa (U/L) jest zdefiniowana jako ilość enzymu, która katalizuje przemianę jednego mikromola substratu na minutę.

$$IU/L = \frac{(A_2 - A_1) \times 1.050 \times 1000}{1 \times 6.22 \times 0.050} = (A_2 - A_1) \times 3376$$

Gdzie:

- (A<sub>2</sub>-A<sub>1</sub>) = Zmiana absorbancji
- 1.050 = Całkowita objętość reakcji w ml
- 1000 = Konwersja U/ml na U/L
- 1 = Droga światła w cm
- 6.22 = Milimolowa absorpcja NADH
- 0.050 = Objętość próbki w ml

Przykład: Jeżeli odczyt początkowy (A<sub>1</sub>) = 0.450  
Odczyt końcowy (A<sub>2</sub>) = 0.480  
(A<sub>2</sub>-A<sub>1</sub>) = 0.03  
Wtedy 0.03 x 3376 = 101 U/L

Uwaga: Dla jednostek SI (nkat/L) pomnóż wynik przez 16,76.

## Wartości oczekiwane<sup>5</sup>

Mężczyzna 50-166 U/L (30°C) 80-285 U/L (37°C)

Kobieta 60-132 U/L (30°C) 103-227 U/L (37°C)

Ze względu na szeroki zakres warunków (dieta, położenie geograficzne, wiek itp.), o których wiadomo, że wpływają na zakresy referencyjne, zaleca się, aby każde laboratorium ustaliło swój własny zakres referencyjny.

## Charakterystyka

- Test: 0-1000 U/L. Próbki, które przekraczają 1000 U/L, należy rozcieńczyć taką samą objętością soli fizjologicznej, ponownie zbadać i pomnożyć wynik przez dwa.

- Korelacja: przeprowadzono badanie pomiędzy analizatorami serii Yumizen 200 i podobnym analizatorem przy użyciu tej metody, uzyskując współczynnik korelacji 0,999 przy równaniu regresji  $y=1.013x + 4.1$ .
- Precyzja: Badania precyzji przeprowadzono po modyfikacji wytycznych zawartych w dokumencie NCCLS EP5-T2.<sup>12</sup>

W ciągu dnia			Całkowita		
Średnia	S.D.	C.V.%	Średnia	S.D.	C.V.%
131.6	4.4	3.4	114.4	2.3	2.0
331.5	6.4	1.9	331.3	7.0	2.1

- Czułość: Czułość płynnego odczynnika LD została zbadana poprzez odczyt zmiany absorbancji przy 340 nm dla próbki wody dejonizowanej i próbek surowicy o znanej aktywności LD. Wykonano dziesięć powtórzeń każdej próbki. Wyniki tego badania wykazały, że w używanym analizatorze odczynnik Liquid LD wykazywał niewielki dryft odczynnika lub nie wykazywał go wcale na próbce zerowej. W opisanych warunkach reakcji zmiana absorbancji o 0,0001 była w przybliżeniu równoważna 1 U/l aktywności LD.

## Piśmiennictwo

- Tietz, N.W., editor, Fundamentals of Clinical Chemistry, 3<sup>rd</sup> Ed., W.B. Saunders Co., 391 (1987).
- Wroblewski, F., LaDue, J.S., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 90:210 (1955).
- Kubowitz, F., Ott, P., Biochem. 314:94 (1943).
- Wacker, W.E.C., et al, N. Engl. J. Med. 255:449 (1956).
- Henry, R.J. et al, Clinical Chemistry; Principles and Technics, 2<sup>nd</sup> Ed., Hagerstown (MD) Harper & Row, pp. 819-831. (1974).
- Amador, E., et al, Clin. Chem. 9:391 (1963).
- Buhl, S.N., et al, Clin. Chem. 23:1289 (1977).
- Gay, R.J., McComb, R.B., Bowers, G.N., Clinical Chemistry, 2<sup>nd</sup> Ed., W.B. Saunders Co., 657 (1976).
- Tietz, N.W., Fundamentals of Clinical Chemistry, 2<sup>nd</sup> Ed., W.B. Saunders Co., 657 (1976).
- Kreutzer, H.H., et al, Clin. Chim. Acta 9:64 (1964).
- NCCLS Document M29-T2, 2<sup>nd</sup> Ed. (1991).
- Young, D.S., et al, Clin. Chem., 21:1D (1975).
- NCCLS Document "Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices", 2<sup>nd</sup> Ed. (1992).

## Symbole

Data przydatności (RRRR-MM-DD)	<b>LOT</b> Nr LOT i kod partii
Numer katalogowy	Producent
Wyłącznie do diagnostyki <i>in vitro</i>	Zakres temperatur
Zapoznaj się z instrukcją użytkownika	<b>Rx Only:</b> Wyłącznie do profesjonalnego użytku
Znak CE	Autoryzowany przedstawiciel na Europę

Wyrodkowano przez HORIBA Instruments Incorporated - Pointe Brand 5449 Research Drive Canton, MI 48188

12-L7572-100

Manufactured by HORIBA Instruments Incorporated – Pointe Brand 5449 Research Drive, Canton, MI 48188

European Authorized Representative:

Obelis s.a.

Boulevard Général Wahis 53

1030 Brussels, BELGIUM

Tel: (32)2.732.59.54 Fax:(32)2.732.60.03 email: mail@obelis.net

## Certyfikacja

Odczynniki Pointe są certyfikowane zgodnie z określonymi parametrami. Każdy odczynnik Pointe, który nie spełnia specyfikacji w podanym terminie ważności, zostanie natychmiast i bezpłatnie wymieniony.