

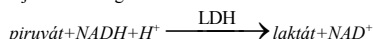
Kódszám:	46461	46462	46463
Kiszérelés:	100 ml (1x50 ml+ 1x50 ml)	600 ml (1x300 ml+ 1x300 ml)	10x20 ml (10x10 ml+ 10x10 ml)

A szérumszervum tejsavdehidrogenáz aktivitásának meghatározására szolgáló reagenskészlet. DGKC ajánlás szerinti UV teszt.

A tejsavdehidrogenáz valamennyi sejten előforduló enzim. Tetramer molekula, amely kétféle szöveti eredetű alegység kombinációjából áll (m-muscle, h-heart). 5 féle izoenzimet különböztetünk meg. (A szérumban a százalékos megoszlás: LDH1 : LDH-2 : LDH-3 : LDH-4 : LDH-5 = 20: 34: 23: 12: 11). A szérumszervum LDH aktivitásának nagy százalékát szívizom és vörösvérsejt eredetű LDH-1, LDH-2 és a májeredetű LDH-5 adja. Az izoenzimek aktivitása egyes szubsztrátumok esetében eltérő. Különböző módon gátolható, pH érzékenyek. Az egyes frakciókat korábban kromatográfiásan, napjainkban elsősorban elektroforézissel választják el és határozzák meg. Az izoenzimek aránya különböző betegségek korjelzője. Szívinfarktust követően 8-12 óra elteltével jelentősen emelkedik az enzim aktivitása, 4-5 nap elteltével csökken. Emelkedést mérünk különböző májbetegségek, egyes anémia, és szöveti károsodások esetében.

A mérés elve

A tejsavdehidrogenáz enzim (LDH) pH=7,5 pufferben NaCl és NADH (koenzim) jelenlétében katalizálja a piruvát átalakulását laktáttá. A NADH átalakulását NAD⁺ formára 340 nm-en abszorbancia csökkenés kíséri. Az abszorbancia változás arányos a szérumszervum tejsav dehidrogenáz aktivitásával.



Referencia-értéktartomány

LDH aktivitás: 240-480 U/l (4,0-8,0 µkat/l)

Minden laboratóriumnak ajánlott a saját normálérték-tartományát meghatározni.

Reagens

1.Reagens (R1)

foszfát puffer, pH=7,50 56 mmol/l

piruvát 1,6 mmol/l

2.Reagens (R2)

NADH 240 µmol/l

Figyelmeztetés

Zavaros reagens felhasználása tilos. A szennyezések elkerülésére csak tiszta laboratóriumi eszközöket szabad használni. A reagensek nátrium-azidot tartalmaznak (0,1%). Az azidvegyületek keletkezésének elkerülése érdekében, a reagens kiöntése után a lefolyót vízzel öblítsük ki.

Minta

Hemolizismentes szérumszervum. Hemolizis zavarja a meghatározást. Stabilitás: 7 nap (2-8°C)

Reagens stabilitása

Fénytől védve és 2-8 °C-on tárolva a reagens

felbontás nélkül: a címkén jelzett időpontig

felbontás után: 35 nap

kalibrációs gyakoriság: 7 nap

onboard stabilitás: 7-35 nap

A stabilitások kizárólag új rendszerflakon használata esetén érvényesek!

A VIZSGÁLAT KIVITELEZÉSE

Munkareagens készítése és stabilitása

•Egykomponensű reagens készítése:

Keverjük össze a reagensket (R1 és R2) azonos arányban.

Stabilitása: 20-25°C-on egy hét

2-8°C-on négy hét

•Eljárás két reagens alkalmazásával:

A reagens felhasználásra kész.

Amennyiben a munkareagens abszorbanciája 334 nm-en nem éri el az 1,1-et, a reagens nem használható.

Mérési eljárás

Hullámhossz: 340 (334-365) nm

Hőmérséklet: 37°C

Mérési mód: kinetikus (csökkenő)

Fényút: 1 cm

Leolvasás: desztillált vízzel szemben

Bemérés egy reagens esetén:

Munkareagens	1 ml
Minta	25 µl

Keverjük össze és egy perces inkubálás után mérjük meg az abszorbanciákat percenként (ΔA/perc), három percen keresztül.

Bemérés két reagens esetén:

R1	1 ml
Minta	50 µl

Keverjük össze és inkubáljuk egy percig.

R2	1 ml
-----------	------

Keverjük össze és egy perces inkubálás után mérjük meg az abszorbanciákat percenként (ΔA/perc), három percen keresztül.

Kalibráció: (DGKC módszerre, 37°C-on)

S1: Desztillált víz

S2: Diagnosticum DunaCal Cat. No.: Dcal

Roche C.F.A.S. (Calibrator for automated system) vagy

Randox Calibration Serum Level I

Ajánlott új kalibrációt végezni:

- új gyártási számú készlet felbontásakor,

- ahogy ezt a laboratórium belső minőségügyi rendszere előírja.

Az eredmény kiszámítása kalibráció esetén

$$\frac{\Delta A_{\text{minta}}}{\Delta A_{\text{standard}}} \times C_{\text{standard}} = C_{\text{minta}}$$

A=abszorbancia,

C=koncentráció

Az eredmények kiszámítása faktorial

334 nm: aktivitás (U/l) = ΔA/perc x 8252

340 nm: aktivitás (U/l) = ΔA/perc x 8450

Belső minőségellenőrzés

A minőségellenőrzés ajánlott minden laboratóriumnak. Két különböző szintű (egy normál és egy emelkedett) kontrollt javasolunk. A kontrollok mért értékeinek a gyártó által meghatározott tartományba kell esniük. Ha a tartományon kívül esnek az értékek, ajánlott korrigálni a méréseket.

A REAGENS TELJESÍTMÉNYJELLEMZŐI

A méréseket Olympus 600-as automatán végeztük (37°C). Átváltás: [U/l]=[µkat/l]x60

Linearitás

A módszer 10 - 1200 U/l (20 µkat/l) LDH aktivitás között lineáris

Kimutatási határ 3,5 U/l (0,05 µkat/l)

Érzékenység

Minden laboratórium számára ajánlott meghatározni saját érzékenységi határt, mivel ezt az alkalmazott spektrofotométer érzékenysége is befolyásolja. A kézi mérés körülményei között 0,001 Abs/min 334 nm-en mért abszorbanciaváltozás megegyezik 8,252 U/l (0,138µkat/l) LDH-P aktivitással.

Precizitás

n=20	Reprodukálhatóság		Ismételhetőség		
minta U/l	SD	CV%	minta U/l	SD	CV%
344,6	3,41	0,99	244	21,5	8,9
523,6	17,13	3,27	435	24,2	5,6

Korreláció

Összehasonlítottuk reagensünket más gyártó LDH-P reagensével.

A korrelációs regresszió adatai a következők:

korrelációs koeficiens: r=0,9987,

lineáris regresszió: y(U/l)=1,042x+13,1

(x= más gyártó reagens, y= saját reagens).

Szelektivitás










Bilirubin 0,5 g/l-ig (855 µmol/l), lipid 10 g/l-ig, glükóz 10 g/l-ig (55,5 mmol/l) aszkorbinsav 0,5 g/l-ig (2,84 mmol/l) nem befolyásolja a mérést.

Megjegyzés

Ne használja a reagenst a csomagolása címkéjén feltüntetett lejárat dátum eltelté után. A készítményeket, tesztoldatokat és reagenseket csak az itt leírt teszthez szabad felhasználni.

Csak in vitro diagnosztikai vizsgálatokra alkalmas.

A címkéken a következő szimbólumok lehetnek

	In vitro diagnosztikai orvostechnikai eszköz		Gyártási szám
	Gyártó		Kódszám
	CE-jelölés		Tárolási irány
	Tárolási hőmérséklet		Biológiai veszély
	Lejárat idő (év/hónap)		

Irodalom

Ann. Biol.Clin.1982, 40: 123

Verzió: 64-DL-2017-01

Felülvizsgálat dátuma: 2017-01

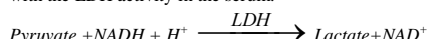
Cat. No.:	46461, 416463	46462, 416464	46463, 416465
Size:	100 ml (1x50 ml + 1x50 ml)	600 ml (1x300 ml + 1x300 ml)	10x20 ml (10x10 ml + 10x10 ml)

Kinetic determination of the lactate dehydrogenase activity in serum based upon DGKC recommendations.

Lactate dehydrogenase (LDH) is present in every cell, it is a tetramere molecule which is a combination of two different tissue components (M-muscle, H-heart). There are five different isoenzymes: LDH-1: LDH-2: LDH-3: LDH-4: LDH-5 = 20: 34: 23: 12: 11. The serum activity is mainly composed of LDH-1, LDH-2 derived from the myocardium and red blood cells, and LDH-5 derived from the liver. The activities of isoenzymes are different in cases of certain substrates. The inhibitors and pH sensitivities are different. The various fractions were determined using chromatography in the past but more recently electrophoresis is the method of choice. The ratio of isoenzymes indicates certain disease states. The enzyme activity significantly increases 8-12 hours following a myocardial infarction and declines after 4-5 days. There is an increase in liver diseases, in certain anaemia and tissue injuries. The enzyme catalyses the Pyruvate / Lactate transformation at optimal pH.

Principle

LDH catalyses the transformation of Pyruvate to Lactate in pH=7.5 Tris buffer with NaCl in the presence of NADH coenzyme. The transformation of NADH to NAD⁺ is accompanied by a decrease in absorbance at 340 nm. The change in absorbance correlates with the LDH activity in the serum.


Reference values

Serum LDH-P activity: 240-480 U/l (4,0-8,0 µkat/l)

It is recommended that each laboratory should assign its own normal range.

Reagents
1.Reagent (R1)

Phosphate buffer, pH=7.50 56 mmol/l
 Pyruvate 1.6 mmol/l

2.Reagent (R2)

NADH 240 µmol/l

Precautions

Discard cloudy reagent. Avoid contamination by using clean laboratory material (pipettes, plastic vials for analyzers,...). These reagents contain sodium azide (0.1 %). To avoid the possible build-up of azide compounds, flush waste-pipes with water after the disposal of undiluted reagent.

Sample

Serum free of haemolysis. Stability: 7 days (2-8°C)

Stability

without opening: till the expiry date indicated on the label
 after opening: 35 days
 calibration frequency: 7 days
 onboard stability: 7-35 days
 Stability data are valid only when using new system bottle!

PROCEDURE
Preparation and stability of working reagent
• One-reagent procedure:

Mix 1 volume of reagent 1 (R1) with 1 volume of reagent 2 (R2).

Stability : at 20-25°C: 1 week
 at 2-8 °C: 4 weeks

• Two-reagent procedure:

The reagents are ready for use.

If the absorbance of working reagent is lower than 1.1 at 334 nm the reagent can not be used.

Assay conditions

Wavelength: 340 (334-365) nm
 Temperature: 37 °C
 Cuvette: 1 cm light path
 Read against: distilled water
 Method: kinetic (decreasing)

• One-reagent procedure:

Working reagent	1 ml
Sample	25µl

Mix and after 1 minute incubation, measure the change of optical density per minute (ΔA/min) during 3 minutes.

• Two-reagent procedure:

R1	1 ml
Sample	50µl

Mix and after 1 minute incubation, add:

R2	1 ml
-----------	------

Mix and after 1 minute incubation, measure the change of absorbance per minute (ΔA/min) during 3 minutes.

Calibration: (37°C, DGKC method)

S1: Distilled water
 S2: Diagnosticum DunaCal Cat. No.: Deal or Roche C.F.A.S. (Calibrator for automated system) or Randox Calibration Serum Level I
 Calibration frequency
 Two point calibration is recommended:

- after reagent lot change,
 - as required following quality control procedures.

Calculation using calibration

$$\frac{\Delta A_{\text{sample}}}{\Delta A_{\text{standard}}} \times C_{\text{standard}} = C_{\text{sample}}$$

A = Absorbance,
 C = Concentration

Calculation using factor

334 nm: Activity (U/l) = ΔA/min x 8252; (µkat/l) = ΔA/min x 137
 340 nm: Activity (U/l) = ΔA/min x 8450; (µkat/l) = ΔA/min x 141

Quality control

A quality control program is recommended for all clinical laboratories. The analysis of control material in both the normal and abnormal ranges with each assay is recommended for monitoring the performance of the procedure. Each laboratory should establish corrective measures to be taken if values fall outside the limits. Recommended controls: Diagnosticum DunaCont N (Cat. No.: Dcon-N) and DunaCont P (Cat. No.: Dcon-P)

PERFORMANCES DATA

The following data were obtained using the Olympus 600 analyzer (37°C). Conversion factor: [U/l]=[µkat/l]x60

Linearity

The method is linear between 10 - 1200 U/l (20 µkat/l)

Limit of detection 3,5 U/l (0,05 µkat/l)
Sensitivity

It is recommended that each laboratory establishes its own range of sensitivity as this is limited by the sensitivity of the spectrophotometer used. Under manual conditions however, a change of 0.001 Abs units/min is equivalent to 8.252 U/l (0,138µkat/l) LDH-P activity at 334 nm.

Precision

n=20 sample U/l	Reproduceability		Repeatability		
	SD	CV%	sample U/l	SD	CV%
344,6	3,41	0,99	244	21,5	8,9
523,6	17,13	3,27	435	24,2	5,6

Correlation

Comparative studies were done to compare our reagent with another commercial LDH-P reagent.

The results from these studies are detailed below.

Correlation coefficient: r = 0,9987

Linear regression: y (U/l) = 1.042x+13.1

(x= other commercial reagent, y= own reagent).

Specificity










Bilirubin 855µmol/l (50mg/dl), lipid 1000mg/dl, glucose 55.5 mmol/l (1000mg/dl) and ascorbic acid 2.84 mmol/l (50mg/dl) don't interfere with the assay up to the given levels.

Note

Haemolysis interferes with the test.

Do not use reagents after the expiry date stated on each reagent container label. Do not use products, test solutions and reagents described above for any purpose other than described herein.

For in vitro diagnostic use only.
The following symbols can be used on the labels

	In vitro diagnostic device		Batch code
	Manufacturer		Catalogue number
	CE-marking		This way up
	Temperature limitations		Biological risk
	Use by (year/month)		

Bibliography

Ann. Biol. Clin. 1982; 40:123.

Version: 64-DL-2017-01

Date of revision: 2017-01