

LDH LÍQUIDA

MÉTODO SFBC

Para la determinación "in vitro" de la lactato deshidrogenasa en suero o plasma

PRINCIPIO DEL TEST

El enzima LDH cataliza la reducción del Piruvato en presencia de NADH como cofactor, que se oxida a NAD⁺ produciéndose un cambio en la Abs del medio. En condiciones óptimas de reacción, la Δ Abs/min es proporcional a la concentración de enzima LDH presente en la muestra.



UTILIDAD DIAGNÓSTICA

Se produce un aumento de los niveles de LDH en suero por la liberación del enzima de los tejidos. Se encuentran valores elevados en hepatitis, mononucleosis infecciosa, tumores malignos, pancreatitis, cirrosis o infarto de miocardio. También aumentan los valores en casos de distrofia muscular o anemias.

Los valores por debajo de los habituales no son clínicamente significativos.

Una única prueba de laboratorio no permite establecer un diagnóstico. Los resultados se han de evaluar en el contexto de todos los datos clínicos y de laboratorio obtenidos.

REACTIVOS

Kit 1 x 50 mL. Ref. 99 18 18. Contiene:

A. 1 x 40 mL Disolución tampón. Ref. 99 13 74
B. 1 x 10 mL NADH tamponado. Ref. 99 32 19

Kit 1 x 125 mL. Ref. 99 00 35. Contiene:

A. 1 x 100 mL Disolución tampón. Ref. 99 00 40
B. 1 x 25 mL NADH tamponado. Ref. 99 00 45

PREPARACIÓN DEL REACTIVO DE TRABAJO

Los reactivos A y B, están listos para su uso.

En caso de que se quiera trabajar como monorreactivo: mezclar los volúmenes deseados manteniendo la proporción de 4 partes de A (disol. tampón) + 1 parte de B (NADH tamponado)

COMPOSICIÓN DEL REACTIVO DE TRABAJO

Las concentraciones en la disolución reactiva son:

Tampón Tris-HCl pH 7,2	80 mM
piruvato sódico	1,6 mM
NaCl	200 mM
NADH	0,20 mM
Estabilizantes y conservantes	

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Los componentes del kit almacenados a 2-8°C, son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Una vez mezclados los componentes A y B, la disolución monorreactiva es estable 4 semanas a 2-8°C y 1 semana a temperatura ambiente ($\leq 25^\circ\text{C}$), siempre que se mantenga al abrigo de la luz.

Indicaciones de alteración de los reactivos:

Presencia de turbidez o de partículas. Blanco del reactivo de trabajo $\leq 1,0$.

MATERIAL NECESARIO NO SUMINISTRADO

Material de uso general de laboratorio.

Espectrofotómetro, fotómetro o analizador automático termostatzado. Cubeta 1 cm de paso de luz.

MUESTRA

Suero o plasma con heparina como anticoagulante. Utilizar muestras exentas de hemólisis. El enzima en suero es estable durante 2 días a 2-8°C.

Las muestras congeladas se inactivan rápidamente.

PRECAUCIONES

El reactivo contiene azida sódica al 0,09%, manipular con precaución.

Las indicaciones de seguridad se encuentran en la etiqueta de los productos. Se aconseja consultar la ficha de datos de seguridad antes de la manipulación del reactivo.

La eliminación de residuos debe hacerse según la normativa local vigente.

CONTROL DE CALIDAD

Es recomendable la inclusión de sueros control, Seriscann Normal (Ref. 99 41 48) y Seriscann Anormal (Ref. 99 46 85) en cada proceso de medida para verificar los resultados.

Se aconseja que cada laboratorio establezca su propio programa de control de calidad y los procedimientos de corrección de las desviaciones detectadas.

AUTOANALIZADORES

Adaptaciones a distintos analizadores automáticos, disponibles bajo demanda.

PROCEDIMIENTO

El método que aquí se describe es el propuesto por la Sociedad Francesa de Biología Clínica Llevar reactivo de trabajo y el instrumento a la temperatura de trabajo. (30° / 37°C).

Técnica monorreactiva	30° / 37°C
Reactivo de trabajo	1,0 mL
Muestra	0,02 mL
Técnica birreactiva	30° / 37°C
Disol. tampón (A)	1,0 mL
Muestra	0,02 mL
Mezclar e incubar aprox. 1 min	
Dis. NADH (B)	0,25 ml

Mezclar y poner en marcha el cronómetro.

Transferir a la cubeta de lectura y leer las absorbancias después de 1, 2, 3 min

Determinar la Δ Abs/min promedio de las lecturas

Lectura

Longitud onda: 334 nm; 340 nm; 365 nm

Blanco: Agua

Cubeta termostatzada: 1 cm paso de luz

CÁLCULOS

Se utiliza la fórmula indicada para obtener el factor para calcular las U/L :

$$U/L = \Delta\text{Abs}/\text{min} \times \frac{V_t \times 10^6}{\epsilon \times l \times V_s}$$

Donde:

Vt: Volumen total de la mezcla de reacción;

Vs Volumen de muestra

l: Paso de luz de la cubeta

ϵ : Coeficiente de extinción molar de NADH:

365 nm: $3,40 \times 10^3$

340 nm: $6,31 \times 10^3$

334 nm: $6,17 \times 10^3$

Determinar la Δ Abs/min obtenida en cada lectura y hallar el valor medio.

$$U/L = \Delta\text{Abs}/\text{min} \times \text{Factor}$$

Factores de cálculo

	Monorreactivo	Birreactivo
334 nm	8252	10275
340 nm	8095	10080
365 nm	15000	18675

VALORES DE REFERENCIA

Adultos (37°C) 200 - 400 U/L

Los valores indicados son a título orientativo. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

PRESTACIONES. CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

Las características de funcionamiento del producto dependen tanto del reactivo como del sistema de lectura manual o automático empleados.

Los siguientes datos se han obtenido manualmente a 37°C y 340 nm.

Sensibilidad, como límite de detección: 10 U/L

Linealidad: Hasta 1800 U/L. Para valores superiores se aconseja diluir la muestra 1/10 con salina (NaCl 0,9%) y repetir el ensayo. Multiplicar el resultado por 10.

Exactitud, como % de recuperación: 98,8%

Precisión en la serie, como Coeficiente de Variación: 1,90 %

Precisión entre series, como Coeficiente de Variación: 2,14 %

Veracidad: Los resultados obtenidos con el reactivo no presentan diferencias significativas al compararlo con el reactivo considerado de referencia.

Los datos detallados del estudio de las prestaciones del reactivo están disponibles bajo demanda.

INTERFERENCIAS

Como anticoagulante se aconseja la utilización de heparina. Los anticoagulantes citrato, oxalato, fluoruro y yodoacetato interfieren en la prueba.

Muestras de actividad muy elevada pueden dar lugar a una reacción muy rápida con extinciones iniciales bajas, al ser consumido el NADH en el primer minuto de reacción. Se aconseja en estos casos repetir el ensayo con la muestra diluida 1/10 con salina (NaCl 0,9%), y multiplicar el resultado por 10.

BIBLIOGRAFÍA

Gay, R.J., McComb, R.B., Bowers, G.N. (1968) Clin. Chem., 14, 740 - 753.

Comission Enzymologie de la Societé Française de Biologie Clinique. (1982) Ann. Biol. Clin., 40, 123 - 128.

Methods of Enzymatic Analysis. (1983) 3rd edition, VIII, 118 - 126, Editado por H.U. Bergmeyer Verlag Chemie.

LDH LIQUID

SFBC METHOD

For "in vitro" determination of lactate dehydrogenase in serum or plasma

PRINCIPLE

The lactate dehydrogenase catalyzes the reduction of pyruvate with the aid of NADH as cofactor, which is oxidized to NAD⁺, giving an absorbance change. In optimum reaction conditions the $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ is directly related to LDH concentration in the sample.



DIAGNOSTIC USE

Increased levels of LDH in serum are found in patients suffering from hepatitis, infectious mononucleosis, malignant tumours, pancreatitis, cirrhosis, or myocardial infarction, due to release of enzyme from the tissue. Values also increase in cases of muscular dystrophy or anemias. Values below the usual are not clinically significant.

Single test result could not be used to make a clinical diagnosis. It should integrate clinical and laboratory data.

REAGENTS

Kit 1 x 50 mL. Ref. 99 18 18. Contents:

A. 1 x 40 mL Buffer solution Ref. 99 13 74
B. 1 x 10 mL Buffered NADH Ref. 99 32 19

Kit 1 x 125 mL. Ref. 99 00 35. Contents:

A. 1 x 100 mL Buffer solution Ref. 99 00 40
B. 1 x 25 mL Buffered NADH Ref. 99 00 45

WORKING REAGENT PREPARATION

Reagents A and B are ready-to-use. If a monoreagent procedure is preferred, then the reagents must be mixed in the ratio: 4 parts of A (buffer solution) + 1 part of B (buffered NADH).

WORKING REAGENT COMPOSITION

The concentrations in the reagent solution are:

Tris-HCl buffer pH 7.2	80 mM
sodium pyruvate	1.6 mM
NaCl	200 mM
NADH	0.20 mM
Stabilizers and preservatives	

STORAGE AND STABILITY

The components of the kit, stored at 2-8°C, will remain stable until the expiration date stated on the label. The monoreagent is stable for 4 weeks at 2-8°C and for 1 week at room temperature ($\leq 25^\circ\text{C}$), when protected from the sunlight.

Signs of reagent deterioration:

Presence of particles or turbidity in the reagent. Working reagent blank ≤ 1.0

ADDITIONAL EQUIPMENT

General laboratory equipment.
Spectrophotometer; automated analyzer or photometer with thermostated cuvette, 1cm light path

SAMPLE

Serum, heparinized plasma. Samples free from hemolysis should be used. The enzyme in serum is stable for 2 days at 2-8°C. Frozen samples are rapidly inactivated.

CAUTION

The reagent contains sodium azide at 0.09%. Handle with care.
The safety statements are on the label. It is advisable to look at the SDS before using the reagent.
The disposal of the residues has to be made according to local regulations.

QUALITY CONTROL

Control serum, Seriscann Normal (Ref. 99 41 48) and Seriscann Anormal (Ref. 99 46 85) should be included in each test series. Each particular laboratory should establish its own control program.

AUTOANALYZERS

Adaptations to different autoanalyzers are available on request.

PROCEDURE

The method described is the one proposed by the French Society of Clinical Biology. Bring the working reagent and the instrument to the working temperature. (30° / 37°C)

Monoreagent technique	30° / 37°C
Working Reagent	1.0 mL
Sample	0.02 mL

Bireagent technique	30° / 37°C
Buffer solution (A)	1.0 mL
Sample	0.02 mL
Mix, incubate for approx. 1 min	
NADH (B)	0.25 mL

Mix, read the absorbance after 1 min and start the stopwatch.
Read again the absorbance after 1, 2 and 3 min.

Determine the average value of $\Delta\text{Abs} / \text{min}$

Reading

Wavelength: 334 nm; 340 nm; 365 nm
Blank: Water
Cuvette: Thermostated; 1cm light-path

CALCULATIONS

The formula indicated is used to obtain the factor to calculate the U/L

$$\Delta\text{Abs}/\text{min} \times \frac{Vt \times 10^6}{\epsilon \times l \times Vs} = \text{U/L}$$

Where:

Vt: Total volume of reaction mixture;

Vs: Sample volume

l: Cuvette light path

ϵ : Extinction coefficient of NADH:

365 nm: 3.40×10^3

340 nm: 6.31×10^3

334 nm: 6.17×10^3

Determine the average value of $\Delta\text{Abs} / \text{min}$.

$$\text{U/L} = \Delta\text{Abs}/\text{min} \times \text{Factor}$$

Factors

	Monoreagent	Bireagent
334 nm	8252	10275
340 nm	8095	10080
365 nm	15000	18675

REFERENCE VALUES

Adults (37°C) 200 - 400 U/L

The stated values are for guidance. Each particular laboratory should establish its own normal range, using its own instrumentation, blood collection methods and test procedures

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The performance characteristics depend on the method used. It is recommended to calculate these data for each particular test protocol. These results have been obtained using a manual method at 37°C and 340 nm.

Sensitivity, as detection limit: 10 U/L

Linearity: Up to 1800 U/L. For higher values, it is recommended to dilute the sample 1/10 in saline (NaCl 0.9%) and assay once again. Multiply the final result by 10.

Accuracy: 98.8 %

Repeatability, as Coefficient of Variation: 1.90%

Reproducibility, as Coefficient of Variation: 2.14%

Trueness: Results obtained with this reagent did not show systematic differences when compared with reference reagent.

Details of the performance studies are available on request.

INTERFERENCES

It is recommended to use heparin as anticoagulant. Others, like citrate, oxalate, or fluoride may interfere with the test. Hemolyzed samples will give false results.

When assaying high activity samples, a very low initial absorbance can be found, which is mainly due to the rapid consumption of the NADH at the early stage of the reaction. In such a case, dilute the sample with saline (NaCl 0.9 %) and assay it once again.

REFERENCES

Gay, R.J., McComb, R.B., Bowers, G.N. (1968) Clin. Chem., 14, 740 - 753.

Comission Enzymologie de la Societé Française de Biologie Clinique. (1982) Ann. Biol. Clin., 40, 123 - 128.

Methods of Enzymatic Analysis. (1983) 3rd edition, VIII, 118 - 126, Editado por H.U. Bergmeyer Verlag Chemie.

LDH LIQUIDE

MÉTHODE SFBC

Pour la détermination in vitro de la lactate déshydrogénase dans le sérum ou le plasma

PRINCIPE

L'enzyme LDH catalyse la réduction du pyruvate en présence de NADH comme cofacteur, qui est oxydé en NAD⁺, produisant un changement dans l'Abs du milieu. Dans des conditions de réaction optimales, la ΔAbs/min est proportionnelle à la concentration d'enzyme LDH présente dans l'échantillon.



UTILITÉ DE DIAGNOSTIC

Une augmentation des niveaux de LDH dans le sérum se produit par la libération de l'enzyme des tissus.

Des valeurs élevées se retrouvent pour l'hépatite, la mononucléose infectieuse, les tumeurs malignes, la pancréatite, la cirrhose ou l'infarctus du myocarde. Les valeurs augmentent également dans les cas de dystrophie musculaire ou des anémies.

Les valeurs inférieures aux valeurs habituelles ne sont pas cliniquement significatives.

Un test de laboratoire unique ne peut pas établir un diagnostic. Les résultats doivent être évalués dans le contexte de toutes les données cliniques et de laboratoire obtenus.

RÉACTIFS

Kit 1 x 50 mL. Réf. 99 18 18. Contenu:

A. 1 x 40 mL Solution tampon Réf. 99 13 74
B. 1 x 10 mL NADH tamponnée Réf. 99 32 19

Kit 1 x 125 mL. Réf. 99 00 35. Contenu:

A. 1 x 100 mL Solution tampon Réf. 99 00 40
B. 1 x 25 mL NADH tamponnée Réf. 99 00 45

PRÉPARATION DU RÉACTIF DE TRAVAIL

Les réactifs A et B sont prêts à l'emploi. En cas d'utilisation de la technique en mode monoréactif mélanger les volumes souhaités, mais en maintenant la proportion 4 volumes de A (solution tampon) + 1 volume de B (NADH tamponné).

COMPOSITION DU RÉACTIF DE TRAVAIL

Les concentrations dans la solution réactive sont les suivantes:

Tampon Tris-HCl pH 7,2	80 mM
pyruvate de sodium	1,6 mM
NaCl	200 mM
NADH	0,20 mM

Stabilisants et conservateurs

CONSERVATION ET STABILITÉ

Conservés entre 2-8°C, les composants du kit sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Une fois les composants A et B mélangés, cette solution monoréactive est stable pendant 4 semaines entre 2-8°C et 1 semaine à température ambiante (≤ 25°C), toujours à l'abri de la lumière.

Les réactifs seront altéré si:

Il existe une présence de particules ou de turbidité. Blanc Réactif de travail ≤ 1,0.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

Matériel courant de laboratoire.
Spectrophotomètre, analyseur automatique ou photomètre thermostaté à 37°C. Cuvette: 1 cm de trajet optique.

ÉCHANTILLON

Sérum ou plasma avec l'héparine comme anticoagulant. Utiliser des échantillons exempts d'hémolyse. L'enzyme est stable dans le sérum pendant 2 jours entre 2-8°C. La congélation inactive rapidement les échantillons.

PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

Le réactif contient de l'azide de sodium (0,09 %) comme conservateur. Les indications de sécurité sont sur l'étiquette des produits. Manipuler avec précaution. On conseille de consulter la fiche des données de sécurité avant de manipuler le réactif. L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux normes en vigueur.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Nous recommandons l'inclusion de sérums de contrôle Seriscann normale (Réf. 99 41 48) et Seriscann anormale (Réf 99 46 85) dans chaque processus de mesure pour vérifier les résultats. Nous suggérons que chaque laboratoire d'établir son propre programme et les procédures de correction des écarts dans les mesures de contrôle qualité.

ANALYSEURS AUTOMATIQUES

Des adaptations à différents analyseurs automatiques sont disponibles sur demande.

TECHNIQUE

La méthode décrite est la proposée par la Société Française de Biologie Clinique. Incuber le réactif et l'analyseur à la température de travail. (30 or 37°C).

Technique monoréactif	30 / 37°C
R. de travail	1,0 mL
Échantillon	0,02 mL

Technique biréactif	30 / 37°C
Solution tampon (A)	1,0 mL
Échantillon	0,02 mL
Mélanger et incuber pendant environ 1 minute	
NADH (B)	0,25 mL

Mélanger puis mettre en marche le chronomètre

Transférer à la cuvette de lecture puis lire les absorbances toutes les minutes pendant 3 minutes Déterminer la valeur ΔAbs/min obtenue à chaque lecture ainsi que la valeur moyenne

Lecture

Longueur d'onde: 334 nm, 340 nm et 365 nm

Blanc: eau

Cuvette: thermostatée de 1 cm de trajet optique

CALCULS

Utiliser la formule indiquée pour obtenir le facteur de calcul des U/L

$$\Delta\text{Abs}/\text{min} \times \frac{\text{Vt} \times 10^6}{\text{E} \times \text{I} \times \text{Vs}} = \text{U/L}$$

Où:

Vt: Total volume of reaction;

Vs: Volume de l'échantillon

I: Trajet optique

E: Coefficient d'extinction de NADH:

365 nm: 3,40 x 10³

340 nm: 6,31 x 10³

334 nm: 6,17 x 10³

Calculer la valeur ΔAbs/min obtenue à chaque lecture ainsi que la valeur moyenne.

$$\text{U/L} = \Delta\text{Abs}/\text{min.} \times \text{Facteur}$$

Facteurs

	Monoréactif	Biréactif
334 nm	8252	10275
340 nm	8095	10080
365 nm	15000	18675

VALEURS DE RÉFÉRENCE

Adultes (37°C): 200- 400 U/L

Les valeurs données sont indicatives. Il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres valeurs de référence.

PERFORMANCE. CARACTÉRISTIQUES DE FONCTIONNEMENT

Le fonctionnement du produit dépend tant du réactif que du système de lecture manuel ou automatique utilisé. Les résultats suivants ont été obtenus avec une méthode manuelle à 37°C et 340 nm

Sensibilité comme limite de détection: 10 U/L

Linéarité: L'essai est linéaire jusqu'à 1800 U/L. Pour des concentrations plus élevées, diluer l'échantillon 1/10 avec une solution saline (NaCl 0,9%). Multipliez le résultat par 10.

Exactitude: le pourcentage de récupération est de 98,8 %.

Coefficient de variation dans la série: 1,90 %

Coefficient de variation entre les séries: 2,14 %

Justesse. Les résultats obtenus avec le réactif ne sont pas significativement différents par rapport au réactif de référence considéré.

L'étude détaillée de la performance du réactif est disponible sur demande.

INTERFÉRENCES

Il est conseillé d'utiliser l'héparine comme anticoagulant. Les anticoagulants de type citrate, oxalate, fluorure et iodoacétate interfèrent avec l'essai. Les échantillons à très haute activité peuvent produire une réaction très rapide avec des extinctions initiales basses, car le NADH est consommé pendant la première minute de la réaction. Dans ces cas, diluer l'échantillon au 1/10 avec une solution saline (NaCl 0,9 %) et répéter l'essai. Multiplier le résultat par 10.

BIBLIOGRAPHIE

Gay, R.J., McComb, R.B., Bowers, G.N., (1968) Clin. Chem., 14, 740 - 753.

Commission Enzymologie de la Société Française de Biologie Clinique. (1982) Ann. Biol. Clin., 40, 123 - 128.

Methods of Enzymatic Analysis. (1983) 3e édition, VIII, 118 - 126, édité par H.U. Bergmeyer Verlag Chemie.