

ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η δραστηριότητα της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) προσδιορίζεται κινητικά, σύμφωνα με τις προδιαγραφές της Γαλλικής Εταιρείας Κλινικής Χημείας (SFBC). Η μέθοδος αυτή όπως και η μέθοδος της Σκανδιναβικής Εταιρείας Κλινικής Χημείας (SSCC) χρησιμοποιούν ρυθμιστικό διάλυμα Tris και υπόστρωμα πυροσταφυλικό. Παρουσία του ενζύμου το πυροσταφυλικό οξύ ανάγεται προς L-γαλακτικό οξύ με ταυτόχρονη οξειδωση του συνενζύμου NADH σε NAD⁺. Η ελαττώση της απορρόφησης στα 340 nm είναι ανάλογη της δραστηριότητας της LDH στο δείγμα.

Πυροσταφυλικό + NADH + H⁺ \xrightarrow{LDH} L-γαλακτικό + NAD⁺

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ

240 - 470 U/L (37°C)

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

R1. Ρυθμιστικό διάλυμα
R2. Διάλυμα υποστρώματος

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ (παρ.1)

Εξαρτάται από τον τύπο του αναλυτή

α) Χρήση μονού αντιδραστήριου:

Αναμίξτε τα δύο αντιδραστήρια σε αναλογία
4 μέρη R₁ με 1 μέρος R₂
(π.χ. 2 ml R₁ + 0,5 ml R₂).

β) Χρήση διπλού αντιδραστήριου:

Τα αντιδραστήρια χρησιμοποιούνται ως έχουν.

ΤΕΛΙΚΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ

Ρυθμιστικό διάλυμα Tris 80 mM, PH 7.2, NaCl 200 mM,
NADH 0.25 mM, πυροσταφυλικά ιόντα 1.6 mM.

ΧΡΟΝΟΣ ΖΩΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Αναγράφεται στο set, σε θερμοκρασία 2-10°C.
Σταθερότητα διαλύματος εργασίας 48h στους 15-30°C
ή 7 ημέρες σε θερμοκρασία 2-10°C.
Σταθερότητα R¹: 30 ημέρες σε θερμοκρασία 2-10°C.
Σταθερότητα R²: επί του αναλυτή 30 ημέρες.

ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΟ ΔΕΙΓΜΑ

Ορός μη αιμολυμένος.
Σταθερότητα της LDH στο δείγμα 7 ημέρες σε θερμοκρασία
15-30°C, 5 ημέρες σε θερμοκρασία 2-10°C ή 6
εβδομάδες στους -20°C.

ΜΕΘΟΔΟΣ

Μήκος κύματος : 340 nm
θερμοκρασία : 37°C
Κυψελίδα : 1 cm
Μεταφέρετε **1ml** από το διάλυμα εργασίας σε σωληνάριο και
επώαστε στους 37°C για 3 min.

- Προσθήκη :

Ορός	:	20μl
-------------	---	-------------

Ανάδευση σε vortex και
άμεση αναρρόφηση στο φωτόμετρο.
Παραμονή 1 min και εν συνεχεία
μετράται η μεταβολή της απορρόφησης ανά λεπτό για τα
επόμενα 3 min .

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ

Με τις παραπάνω συνθήκες ο συντελεστής (factor) έχει τιμή
8095 και η δραστηριότητα του ενζύμου υπολογίζεται από την
σχέση:

$$LDH (U/L)_{37^{\circ}C} = \Delta A / \text{min} \times 8095$$

ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ

Μέχρι 1500 U/L ανάλογα με τον τύπο του αναλυτή.

CALIBRATOR/ ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ (Δεν παρέχονται με το kit)

Biomultical, Bionorm, Biopath

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

1. Το NADH είναι εξαιρετικά ευαίσθητο σε οξειδωτικούς παράγοντες, γι αυτό κάθε σκεύος που χρησιμοποιείτε, φροντίστε να είναι σχολαστικά καθαρό.
2. Ανεξάρτητα εάν η θερμοκρασία της κυψελίδας του φωτομέτρου είναι στους 37°C, ο χρόνος επώασης δεν επαρκεί ώστε να ανέλθει και το διάλυμα στη θερμοκρασία αυτή, ειδικά εάν είναι ψυχρό. Λαμβάνοντας υπόψη ότι 1°C διαφορά θερμοκρασίας προκαλεί σφάλμα περίπου 10%, για καλύτερη επαναληπτικότητα είναι αναγκαίο να προεπωάζετε το διάλυμα εργασίας.
3. Οι επί μέρους παραμέτροι του προσδιορισμού, χρόνος προεπώασης, χρόνος επώασης, όρια ελέγχου τυφλού κ.τ.λ. εξαρτώνται από τον τύπο του φωτομέτρου. Για λεπτομερή προγράμματα παρακαλούμε συμβουλευτείτε την εταιρεία μας.
4. Εάν η δραστηριότητα του ενζύμου είναι εκτός των ορίων γραμμικότητας της μεθόδου αραιώστε το δείγμα με φυσιολογικό ορό σε αναλογία 1:1 επαναλάβετε τον προσδιορισμό και πολλαπλασιάστε τα αποτελέσματα επί 2.

ΤΕΧΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Γραμμικότητα (Linearity): Η αντίδραση είναι γραμμική στην περιοχή συγκεντρώσεων από 12-1500 U/L

Αναλυτική ευαισθησία - όριο ανίχνευσης (Sensitivity):

Το όριο ευαισθησίας του προσδιορισμού υπολογίστηκε ότι αντιστοιχεί με 12 U/L

Πιστότητα (Precision):

Επαναληψιμότητα (Repeatability):

A. Δεδομένα εντός του αυτού κύκλου ανάλυσης:

Αριθμός δειγμάτων	Μέση Τιμή	SD U/L	CV %
20	302	5,97	1,97
20	582	6,75	1,16
20	598	9,30	1,55

Αναπαραγωγιμότητα (Reproducibility):

B. Δεδομένα διαφόρων κύκλων και ημερών ανάλυσης:

Αριθμός δειγμάτων	Μέση Τιμή	SD U/L	CV %
26	108,5	4,25	3,93
26	186	4,10	2,23
28	248	5,87	2,36

Παρεμποδίσσεις - αλληλεπιδράσεις (Interferences):

Δεν παρουσιάζουν σημαντική αναστολή μέχρι τα αναφερόμενα όρια

Παρεμποδιστής	Έκφραση σε	Όρια mg/dl
Αιμόλυση	Αιμοσφαιρίνη	~0
Θολρότητα	Τριγλυκερίδια	~1400
Ίκτερος	Χολερυθρίνη	~50

Και η ελάχιστη ορατή αιμόλυση προκαλεί λανθασμένο θετικό αποτέλεσμα λόγω του ότι το ένζυμο περιέχεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια.

Ανάλυση παλινδρόμησης (Regression Analysis):

Μέθοδος: Γραμμική παλινδρόμηση (Linear Regression)

Αριθμός Δειγμάτων : 39

Όρια συγκέντρωσης : 290-1060 U/L

Σχέση : $y = -3,25 + 1,0 x$

Όπου y η παρούσα μέθοδος και x παρεμφερής μέθοδος προσδιορισμού.

Συντελεστής συσχέτισης $r=0,995$

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Van der Auwera, C. et al. Clin. Chem. (1982) 30 (8): 870

ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ

R1 : 3x328ml R2 : 1 x 21 ml

R2 : 16x274ml R2 : 3 x 22 ml

R1 : 2 x 20 ml R2 : 2 x 5 ml