



## Stanbio LDH Liqui-UV® Procedure No. 2940

For the Quantitative Determination of Lactate Dehydrogenase in Serum and EDTA Plasma.

### Summary and Principle

Elevations in serum lactate dehydrogenase (LDH) occur from myocardial infarction, liver disease, pernicious and megaloblastic anemias, pulmonary emboli, malignancies, and muscular dystrophy<sup>1</sup>. A combined analysis of lactate dehydrogenase and creatine kinase, particularly the isoenzymes of each, provides a definite diagnosis of acute myocardial infarction.<sup>2</sup>

The procedure presented is essentially the Buhl and Jackson<sup>3</sup> modification of Wacker<sup>4</sup> which optimizes reaction conditions.

LDH specifically catalyzes the oxidation of lactate to pyruvate with the subsequent reduction of NAD to NADH. The rate at which NADH forms is proportional to LDH activity. The method described determines NADH absorbance increase per minute at 340 nm.

### Reagent

#### LDH Buffer (Reagent 1), Ref. No. 2941

L-Lithium Lactate	100mmol/L
2-Methyl-2-Amino-1-Propanol pH 8.8	600mmol/L

#### LDH Enzyme (Reagent 2), Ref.No. 2942

NAD	6mmol/L
-----	---------

**Precautions:** The reagents are for "In Vitro Diagnostic Use". Normal precautions exercised in handling laboratory reagents should be followed. The reagents contain sodium azide which may be toxic if ingested. Sodium azide may also react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Refer to Material Safety Data Sheet for any updated risk, hazard or safety information.

**Reagent Preparation:** Buffer and enzyme liquid reagents are supplied ready-to-use. Prepare Working Reagent in the ratio of 5 parts Buffer (R1) to 1 part Enzyme(R2) (i.e., 25 mL Buffer and 5 mL Enzyme).

**Reagent Storage and Stability:** Reagents are stable until the expiration date on their respective labels, when properly stored at 2-8°C and protected from light. R1 and R2 should appear clear and colorless. Discard if either appears cloudy or contains particulate matter. The Working Reagent is stable for 2 weeks at 2-8°C or 1 day at room temperature (15-30°C).

### Materials Required But Not Provided

Spectrophotometer capable of absorbance reading at 340 nm and 1 cm lightpath • Constant temperature block or bath, 37°C, or temperature controlled cuvet well • Accurate pipetting devices  
Test tubes • Interval timer

### Specimen Collection and Preparation

Clear, unhemolyzed serum is the specimen of choice. Plasma may be used if collected with EDTA.

**Sample Stability:** Serum LDH activity is reportedly stable at 2-8°C for 3 days. Frozen samples show decreased activity of isoenzymes LD-4 and LD-5 and, therefore of total LDH values.

**Interfering Substances:** Heparin, citrate and oxalate inhibit the assay. Icteric and lipemic serum require a serum blank. Young et al.<sup>5</sup> have reviewed the effects of drug and other conditions of LDH levels.

### Automated Analyzers

#### Parameters:

Wavelength .....	340 nm
Reaction Type .....	Kinetic
Reaction Direction .....	Increasing
Reaction Temperature .....	37°C
Sample/Reagent Ratio .....	1:20
Equilibration Time .....	60 Seconds
Read Time .....	60 Seconds
Blank Absorbance Limit .....	0.450A
High Absorbance Change/Min .....	0.120 ΔA/Min.
Factor .....	3376
Low Normal .....	80 U/L
High Normal .....	285 U/L
Linearity .....	800 U/L
Cuvet Lightpath .....	1.0 cm

Above parameters should be employed in programming automated analyzers for LDH. Consult your instrument manual for programming instructions.

### Manual Procedure

1. Prepare LDH working reagent according to instructions.
2. Zero spectrophotometer at 340 nm with distilled water.
3. For each sample and control, add 1.0 mL Working Reagent to cuvet or test tube and warm to 37°C for 3 minutes.
4. Add 50 μL (0.050 mL) serum to its respective tube and mix gently.
5. Read and record absorbance at 1 minute. Continue incubating at 37°C and record absorbance again at 2 and 3 minutes. Rate should be constant.
6. Determine the average absorbance per minute (ΔA/min), multiply by factor 3376 for results in U/L.

**NOTE:** If cuvet is not temperature controlled, incubate samples at 37°C between readings.

**Quality Control:** Stanbio Ser-T-Fy® I, Normal Control Serum, Cat. No. G427-86 and Stanbio Ser-T-Fy® II, Abnormal Control Serum, Cat. No. G428-86 are recommended for verifying accuracy and precision. Other commercially available controls with LDH values assayed by this method are also suitable. LDH activity determined in these materials, by this procedure should fall within the ranges stated for the controls. Two levels of controls should be analyzed each day of testing.

**Calibration:** LDH activity is based on the "micromolar extinction coefficient" of NADH at 340 nm (see "Results" section). The instrument manufacturer's calibration guidelines should be followed to calibrate your analyzer.

### Results

Values are derived based on the "absorptivity micromolar extinction coefficient" of NADH at 340 nm (0.00622). A unit per liter (U/L) of LDH activity is that amount of enzyme which produces one μmol/L of NADH per minute.

$$U/L = \frac{\Delta A/Min}{Absorptivity} \times \frac{Total Volume}{Sample Volume}$$

$$U/L = \frac{\Delta A/Min}{0.00622} \times \frac{1.050}{0.050}$$

$$U/L = \Delta A/Min \times 3376$$

### Expected Values<sup>6</sup>

Males	80-285 U/L (37°C)
Females	103-227 U/L (37°C)

This range should serve only as a guideline. It is recommended that each laboratory establish its own range of expected values, since differences exist between instruments, laboratories, and local populations.

### Performance Characteristics<sup>7</sup>

**Comparison:** A group of 70 sera ranging in LDH activity from 64 - 504 U/L was assayed by the described LDH method and by a similar commercially available LDH reagent. Comparison of the results yielded a correlation coefficient of 0.999 and the regression equation was  $y = 1.108x + 1.582$ . (Comparison studies were performed according to NCCLS Tentative Guideline, EP9-T).

**Linearity:** Linear to 800 U/L. Samples exceeding this value should be diluted 2-fold (1 + 1) with deionized water, the assay repeated and results multiplied by 2.

### References

1. Kachmar JF, Moss DW. In Fundamentals of Clinical Chemistry, 2nd ed. NW Tietz, Editor. WB Saunders, Philadelphia, 1976, p652
2. Roe CR et al. J Lab Clin Med 80:557, 1972
3. Buhl SN, Jackson KY. Clin Chem 24:828, 1978
4. Wacker WEC et al. New Engl J Med 255:449, 1956
5. Young DS et al. Clin Chem 21:323D, 1975 (Special Issue)
6. Henry RJ et al. Clinical Chemistry; Principles & Techniques, 2nd ed., Harper & Row, Hagerstown MD pp 819-831, 1974.
7. Stanbio Laboratory Data

Manufactured By:  
Stanbio Laboratory • 1261 North Main Street • Boerne, Texas 78006 USA  
Ph: (830) 249-0772 • Fax (830) 249-0851 • e-mail: stanbio@stanbio.com  
<http://www.stanbio.com>  
DN: RBR.2940CE.02 • Last Revision: 04/04 • Procedure No. 2940CE



## Stanbio LDH Liqui-UV®

### Procedimiento No. 2940

Para la determinación Cinética cuantitativa de LDH en suero y plasma con EDTA para procedimientos Manuales o Automatizados.

### Resumen y Principios

La elevación de la dehidrogenasa láctica (LDH) en el suero, ocurre desde infarto al miocardio, enfermedades del hígado, anemia perniciosa y megaloblastica, embolia pulmonar, enfermedades malignas y distofia muscular.<sup>1</sup> El análisis combinado de dehidrogenasa láctica y creatina kinasa, particularmente los enzimas de cada una confirma el diagnóstico definitivo del infarto agudo al miocardio.<sup>2</sup>

El método es el original de Buhl y Jackson<sup>3</sup> modificado por Wacker<sup>4</sup>, quienes optimizaron las condiciones de reacción.

La LDH específicamente cataliza la oxidación de lactato a piruvato con la subsecuente reducción del NAD a NADH. La velocidad a la cual se forma la NADH es proporcional a la actividad de la LDH. El método descrito determina el aumento de absorbancia por minuto a 340nm.

### Reactivos

#### LDH Buffer (R1), Ref. No. 2941

Composición:  
Lactato Litio 100 mmol/L  
2-Methyl-2-Amino-1-Propanol, pH 8.8 600 mmol/L

#### Enzima LDH (R2), Ref. No. 2942

Composición:  
NAD 6.0 mmol/L

**Precauciones:** Los reactivos son para uso de diagnóstico in vitro. Precauciones normales en el manejo de los reactivos en el laboratorio deben ser seguidas. Los reactivos contienen azide de sodio que puede ser tóxico si se ingiere. El azide de sodio también puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías formando metales azide altamente explosivos. Refiérase a las hojas de Materiales de Seguridad para estar al tanto de la información de seguridad y riesgos.

**Preparación del Reactivo:** Los reactivos líquidos de buffer y enzima, son suministrados ya listos para su uso. Prepare el reactivo con el que trabajará a razón de 5 partes de buffer (R1) y 1 de enzima (R2) (ej: 25 mL de buffer y 5 mL de enzima).

**Almacenamiento y Estabilidad del Reactivo:** El reactivo se mantiene estable hasta la fecha de expiración que está en la etiqueta y cuando se almacena adecuadamente de 2 a 8°C y protegido contra la luz. Los reactivos deben verse claros y sin color. Desechélo si alguno aparece turbio o si contiene partículas de materia. El reactivo a utilizar, está estable por 2 semanas si se mantiene de 2 a 8°C o 1 día a temperatura ambiente (de 15 a 30°C).

### Materiales Requeridos Pero No Incluidos

Espectrofotómetro capaz de leer absorbancias a 340 nm y 1 cm para paso de luz • Baño María (37°C) o celdillas de temperatura controlada •

Pipetas capaces de medir exactamente • Tubos de prueba • Cronómetro

### Recolección y Preparación de la Muestra

Un suero claro y no hemolizado libre de hemólisis, deberá ser utilizado. Plasma puede ser usado si se recolecta con EDTA. Siempre que sea posible, los especímenes deben ser separados y analizados el día que se recolectan. El suero LDH es relativamente estable por un mínimo de 3 días, si la muestra es refrigerada (de 2 a 8°C). Guarde el suero en tubos bien tapados.

**Interferencia de Sustancias:** La heparina, los citratos y los oxalatos inhiben el ensayo. Los sueros ictericos y lipémicos requieren de un blanco de suero. Ciertas drogas y otras sustancias también se conocen que afectan los valores del LDH.<sup>5</sup>

### Analizador Automatizado

#### Parámetros:

Longitud de onda ..... 340 nm  
Tipo de reacción ..... Cinética  
Dirección de la reacción ..... Creciente  
Temperatura de reacción ..... 37°C  
Relación muestra/reactivo ..... 1:20  
Tiempo de lectura ..... 60 segundos  
Tiempo de lag ..... 60 segundos  
Absorbancia límite del blanco ..... 0.450 A  
Cambio de absorbancia alta/min ..... Δ 0.120 A/Min.  
Factor ..... 3376  
Valor normal bajo ..... 80 U/L (37°C)  
Valor normal alto ..... 285 U/L (37°C)  
Linealidad ..... 800 U/L  
Paso de luz de la celda ..... 1 cm

Los parámetros arriba mencionados deberán usarse cuando se programen los analizadores para LDH. Consulte su manual del instrumento para instrucciones de programación.

### Procedimiento Manual

1. Prepare el reactivo de LDH con la que va a trabajar de acuerdo a las instrucciones.
2. Calibre el cero del espectrofotómetro a 340 nm con agua destilada.
3. Para cada muestra y control, añada 1.0 mL del reactivo dentro de la cubeta o en un tubo de prueba e incube por 3 minutos a 37°C.
4. Agregue 50µL (0.050 mL) de suero a sus respectivos tubos y mezcle suavemente.
5. Lea y anote el cambio en la absorbancia cada minuto. Continúe incubando a 37°C y anote los cambios en la absorbancia nuevamente a 2 y 3 minutos. Los valores deben ser constantes.
6. Determine el promedio de la absorbancia por minuto (A/Min), multiplíquelo por el factor 3376 para obtener resultados en U/L.

**NOTA:** Si la cubeta no tiene temperatura controlada, incube las muestras a 37°C entre cada lectura.

**Control de calidad:** El control de suero normal Ser-T-Fy® I, Cat. No. G427-86 y el control de suero anormal Ser-T-Fy® II, Cat. No. G428-86 son recomendables para verificar precisión y exactitud. Otros controles comerciales disponibles con valores de LDH ensayados por este método son también convenientes. La actividad de la LDH determinada en esos materiales, por este procedimiento, deberá caer dentro de los rangos fijados para los controles. Dos niveles de controles deben ser analizados cada día que se prueben.

**Calibración:** La actividad de la LDH, se basa en “un coeficiente de extinción micromolar” de NADH a 340 nm (vea la sección de “Resultados”). La guía de calibración del instrumento por el fabricante, debe ser seguida para calibrar su analizador.

### Resultados

Los valores se derivan en base al “coeficiente de extinción de absorptividad micromolar” de NADH 340 nm (0.00622). La actividad en unidades por litro (U/L) de LDH, es la cantidad de enzima que produce 1 µmol/L de NADH por minuto.

$$U/L = \Delta A / \text{Min} \cdot \text{Absorptividad} \times \text{Volumen total} / \text{Volumen de la muestra}$$

$$U/L = \Delta A / \text{Min} / 0.00622 \times 1.050 / 0.050$$

$$U/L = \Delta A / \text{Min} \times 3376$$

### Valores Esperados<sup>6</sup>

El rango normal : Hombres: 80 - 285 U/L (37°C)  
Mujeres: 103-227 U/L (37°C)

Este rango únicamente debe servir como guía. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos de valores esperados, ya que existen diferencias entre instrumentos, laboratorios y la población local.

### Características<sup>7</sup>

**Comparación:** Un grupo de 70 sueros dentro de un rango de actividad de LDH de 64 a 504 U/L, fueron probados por el método de LDH descrito y por un reactivo comercial similar disponible. Al comparar resultados se produjo un coeficiente de correlación de 0.999 y la ecuación de regresión fue  $y = 1.108x + 1.582$ . (Otros estudios comparativos fueron realizados de acuerdo con las guías tentativas de la NCCLS, EP9-T.)

**Linealidad:** Es lineal a 800 U/L y a 37°C. Llevado a cabo de acuerdo a las guías EP6-P de la NCCSL.

### Referencias

1. Wilkinson JH. Principles and Practice for Diagnosis Enzymology. Year Book Medical Publishers, 1976
2. Kachmar JR: Enzymes. In Fundamentals of Clinical Chemistry, NW Tietz, Editor, Saunders, Philadelphia, 1976, p 674.
3. Sacks HJ, Lanchantin GF: An elevation of serum transaminase in the jaundice state. Am J Clin Pathol 33:97, 1960
4. Karmen A: A note on the spectrophotometric assay of glutamic-oxalacetic transaminase in human blood. J Clin Invest 34:131, 1955
5. Bergmeyer HU, Scheibe P, Wahlefeld AW: Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. Clin Chem 24: 58, 1978.
6. Expert Panel of Enzymes of the International Federation of Clinical Chemistry: Part 3. Revised IFCC method for aspartate aminotransferase. Clin Chem 24:720, 1978.
7. Demetriou JA et al. In Clinical Chemistry - Principles and Technics 2nd ed. RJ Henry et al. Eds. Harper & Row, Hagerstown MD, 1974, p 873.
8. International Federation of Clinical Chemistry. Provisional Recommendations on IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentrations of Enzymes. Clin Chem 23: 887, 1977.
9. Young D.S. Effects of drugs on clinical laboratory tests. AACC Press, Washington D.C., 1990
10. Henry JB. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 17th ed. WB Saunders Co., 1984, p 1437.
11. Stanbio Laboratory Data

Para asistencia técnica llame: 800-531-5535 • (830) 249-0772  
Fax (830) 249-0851 • e-mail: stanbio@stanbio.com  
<http://www.stanbio.com>

Stanbio Laboratory • 1261 North Main Street • Boerne, Texas 78006  
DN: RBR.2940CE.02 • Last Revision: 04/04 • Procedure No. 2940CE