


L-LACTIC ACID

Per uso diagnostico in *Vitro***DETERMINAZIONE QUANTITATIVA UV dell'ACIDO L-LATTICO su PLASMA, URINE e LIQUOR con Analizzatore MINDRAY BS-300** (488 tests (5 x 20 mL))**REF NALA8810**

I. DESTINAZIONE D'USO

L'acido L-lattico, e il suo sale lattato, sono acidi carbossilici che giocano un ruolo in vari processi biochimici. L-lattato è costantemente prodotto dal piruvato via lattato deidrogenasi (LDH) durante il normale metabolismo e l'esercizio. Non aumenta in concentrazione fino a che la velocità di produzione del lattato non supera la velocità di rimozione del lattato, che è governata da una serie di fattori, inclusi trasportatori di monocarbossilati, la concentrazione o le isoforme dell' LDH e la capacità ossidativa dei tessuti. L'aumento del lattato prodotto può essere rimosso in vari modi, tra cui:

- ossidazione a piruvato da cellule muscolari ben ossigenate; viene poi utilizzato per alimentare direttamente il ciclo di Krebs.
- conversione a glucosio attraverso la gluconeogenesi nel fegato e rilascio poi nella circolazione. Se non rilasciato, il glucosio può essere utilizzato per costruire le riserve di glicogeno nel fegato, se sono vuote.

Lattato, e non glucosio, viene preferenzialmente metabolizzato dai neuroni del cervello; le cellule gliali sono responsabili nel trasformare il glucosio in lattato, e per fornire lattato ai neuroni.

Il ruolo del lattato per il metabolismo del cervello sembra essere ancora più importante nelle fasi iniziali dello sviluppo precoce (prenatale e postnatale), con il lattato che in queste fasi ha concentrazioni più elevate nei liquidi corporei.

La produzione patologica di lattato si verifica quando vi è insufficiente apporto di ossigeno nei tessuti, o se è difettosa la trasformazione del piruvato o se vi è aumento della produzione di piruvato. La acidosi lattica di tipo A si verifica quando vi è ipossia tissutale evidente; di tipo B, quando l'ipossia tissutale non è evidente. L'ipossia è di gran lunga la causa più comune di acidosi lattica e può verificarsi per uno shock per qualsiasi causa. Altri fattori che possono causare ipossia tissutale includono asma grave, grave anemia e avvelenamento da monossido di carbonio o da cianuro.

II. PRINCIPIO

L'acido L-lattico viene trasformato in piruvato dalla L-LDH (lattato deidrogenasi) in presenza di NAD. Contemporaneamente avviene un'altra reazione che trasforma il piruvato formato prima in presenza di L-glutamato e GPT (glutamato-piruvato transaminasi). L'intensità in UV a questa lunghezza d'onda è proporzionale alla concentrazione di acido L-Lattico nel campione esaminato.

III. PRECAUZIONI D'USO

1. Questo prodotto è stato formulato per uso diagnostico in vitro.
2. Una variazione proporzionale dei volumi di reazione non modifica il risultato.
3. NON miscelare tra loro Reagenti da diversi lotti di produzione.
4. Per concentrazioni di Acido L-Lattico maggiori di 400 mg/L (4.44 mmol/L), diluire il campione 1:4 con soluzione fisiologica, ritestare e moltiplicare il risultato x 4.
5. Oltre alle eventuali indicazioni di rischio, il Reagente contiene conservanti (sodio azide o altri), la cui concentrazione totale è inferiore ai limiti riportati nelle Dir. 67/548/CEE e 88/379/CEE e relative modifiche per la classificazione, etichettatura ed imballaggio di preparati pericolosi (Reagenti). Tuttavia si raccomanda di manipolare i reagenti con cautela, evitandone l'ingestione ed il contatto con gli occhi, la pelle e le mucose; di seguire quindi le norme di buona pratica di laboratorio nell'utilizzo di questi materiali. Nelle schede di sicurezza vengono descritte le procedure operative per la manipolazione di questo prodotto. Le schede di sicurezza vengono fornite su richiesta.

ATTENZIONE!

- A) Le applicazioni su analizzatori di routine possono essere totalmente diverse da quanto sviluppato come determinazione manuale; inoltre le procedure sono specifiche per ciascun analizzatore.
 - B) Elevata attenzione deve essere data alle sostanze interferenti: alcuni farmaci ed altre sostanze potrebbero influenzare i livelli od il dosaggio di Acido L-Lattico (cfr Bibliografia 2).
 - C) Il Reagente deve essere impiegato SOLO per l'uso indicato, da personale esperto e addestrato, seguendo le norme della buona pratica di laboratorio.
 - D) La diagnosi clinica non può essere fatta correttamente usando il risultato di un solo test, ma deve essere fatta integrando criticamente i risultati di diversi test di laboratorio con differenti dati clinici.
 - E) Una serie di fattori, quali la temperatura ambientale, la temperatura dei reagenti di lavoro, l'accuratezza dei lavaggi e il tipo di spettrofotometro, possono influire sulle prestazioni del test.
 - F) Il **R1 - BUFFER** è fornito in eccesso.
 - G) La curva di calibrazione deve essere sempre ripetuta ad ogni cambio di lotto del Reagente e/o del calibratore.
 - H) Per la manipolazione dei Reagenti devono essere osservate le precauzioni normalmente adottate in laboratorio.
- Tutti i calibratori e controlli vanno considerati come campioni umani, quindi potenzialmente infettivi; devono quindi essere adottate tutte le misure di protezione adeguate allo scopo di evitare ogni tipo di potenziale rischio biologico.

IV. REAGENTI E MATERIALI FORNITI

Composizione del kit:

R1 - BUFFER		REF NALA8810
Good buffer	> 10 mmol/L	3 x 70 mL
R2 - NAD, LDH		5 x 20 mL
Acido Glutammico	> 3 mmol/L	
NAD	> 0.4 mmol/L	
LDH	> 300 U/L	
R3 - GPT (ALAT)		1 x 2.5 mL
(PRONTO ALL'USO)		
GPT(ALAT)	> 20 U/L	
NaN ₃	< 0.1%	

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Normale attrezzatura da laboratorio.
Micropipette in grado di erogare da 3 a 1000 µL.
Puntali monouso per micropipette.

Provette in vetro trasparente per la diluizione dei campioni.
Soluzione fisiologica e Controlli
Spettrofotometro od analizzatore automatico di chimica clinica.



REAGENTI AUSILIARI PER IL CONTROLLO QUALITA'

Per garantire l'adeguata prestazione del test utilizzare i seguenti kit (vedere le relative informazioni d'uso (IFU)):

- SUBSTRATE ELEVATED CONTROL Iyo **REF OG3005**

- SUBSTRATE LOW CONTROL Iyo **REF OG3006**

La curva di calibrazione deve essere sempre ripetuta ad ogni cambio di lotto del Reagente e/o del calibratore.

V. CONSERVAZIONE E STABILITÀ

I Reagenti chiusi sono stabili fino alla data di scadenza indicata sulle etichette, se conservati nel loro contenitore primario integro, a 2-8°C se non esposti a fonti termiche e/o variazioni di pressione. In caso di danneggiamento del contenitore primario provvedere allo smaltimento.

VI. PREPARAZIONE DEL REAGENTE DI LAVORO

Dissolvere un vial di **R2 - NAD, LDH** con 20 mL di **R1 - BUFFER**, mescolare gentilmente evitando la formazione di schiuma. Portare i Reagenti alla temperatura di lavoro prima dell'uso. Chiudere immediatamente dopo l'impiego. I prodotti vanno manipolati in modo adeguato, tale da evitare ogni contaminazione. L'uso non competente ci solleverà da ogni responsabilità.

VII. STABILITÀ DEL REAGENTE DI LAVORO

Il REAGENTE DI LAVORO è stabile 1 giorno a 2-8°C.

VIII. CAMPIONI

- Plasma fresco non emolizzato e non lipemico, SOLO con NaF;
- Urine;
- Liquor (CSF)

Usare campioni limpidi; se necessario filtrare.

Usare campioni a pH neutro; neutralizzare i campioni acidi ad un pH neutro (max pH ≤ 8.0);

Raccolta dei campioni in accordo con CLSI (NCCLS) (cfr Bibliografia 3).

I campioni possono essere conservati fino a 6 giorni a 2-8°C (cfr. Bibliografia 1).

IX. SMALTIMENTO DEI MATERIALI

Per lo smaltimento dei Reagenti attenersi agli ordinamenti locali vigenti.

X. PROCEDURA ANALITICA su SPETTROFOTOMETRO MANUALE

- Lunghezza d'onda: 340 nm (334-365 nm)
- Cammino ottico: 1 cm
- Lettura: contro aria o acqua distillata
- Temperatura: 37°C
- Metodo: end point
- Reazione: 8 - 13 minuti
- Rapporto campione/reagente: 1/40/1

Portare i reagenti alla temperatura di lavoro prima dell'uso.

Pipettare nelle provette o nelle cuvette così etichettate: R/B: bianco reagente; S: Campione

	R/B	S
REAGENTE DI LAVORO	1000 µL	1000 µL
Acqua distillata	25 µL	----
Campione	----	25 µL

Miscelare ed incubare per circa 3 minuti a 37°C. Misurare l'assorbanza AS1 e AR/B1. Poi aggiungere:

R3 - GPT (ALAT)	25 µL	25 µL
------------------------	-------	-------

Miscelare con attenzione, incubare a 37°C ed aspettare la fine della reazione (5-10 minuti). Leggere AS2 e AR/B2.

Calcolare per il campione $AS = (AS2 - AS1)$; calcolare per il Bianco reagente $AR/B = (AR/B2 - AR/B1)$.

Calcolare la differenza $\Delta A = AS - AR/B$.

ATTENZIONE!

Il kit è sperimentato per spettrofotometro manuale e per sistemi HITACHI, COBAS e MINDRAY.

Le applicazioni su analizzatori automatici possono essere totalmente diverse da quanto sviluppato come determinazione manuale.

XI. VALORI DI RIFERIMENTO (cfr Bibliografia 1)

Valori normali Acido L-Lattico:

PLASMA venoso 4.5-19.8 mg/dL (0.5-2.2 mmol/L) arterioso 4.5-14.4 mg/dL (0.5-1.6 mmol/L)

URINE 496-1982 mg/24 h (5.5-22 mmol/24 h)

CFS adulti 10-22 mg/dl (1,1-2,4 mmol/l)

Poiché i valori normali dipendono dall'età, dal sesso, dalla dieta, dall'area geografica e da altri fattori, ogni laboratorio deve stabilire i propri valori normali per questa procedura.

XII. CALCOLO

Usare questa formula generale per calcolare la concentrazione:

Conc. dell' Ac. Lattico (g/L) = $V/v \times 1/\epsilon d \times PM/1000 \times \Delta A$

V = volume totale del test = 1.050 ml

v = volume del campione = 0.025 ml

d = cammino ottico = 1 cm

ϵ = coeff. molare NADH = 6.3 L / mmol x cm

PM = PM acido lattico = 90.1

così diviene:

Conc. dell' Ac. Lattico (g/L) = 0.601 x ΔA



XIII. PRESTAZIONI ANALITICHE (validate su MINDRAY BS300)

Le prestazioni del Reagente **L-LACTIC ACID** sono state sperimentate con un analizzatore MINDRAY BS300. I dati, pur rappresentando le caratteristiche del prodotto, potrebbero variare per ogni singolo laboratorio e per i diversi analizzatori.

Limitazioni del metodo: non sono conosciute limitazioni.

Linearità del metodo: il test è lineare fino a 400 mg/L

(4.44 mmol/L). Per concentrazioni ≥ 400 mg/L (4.44 mmol/L), diluire il campione 1:4 con soluzione salina, ripetere la determinazione e moltiplicare il risultato x 4.

Sensibilità del metodo (LoD) : il limite di sensibilità, ovvero la concentrazione minima che può essere distinta dallo zero è 2 mg/L (0.02 mmol/L).

Interferenze: cfr Bibliografia punto 2.

Criterio delle prove di interferenza: recupero $\pm 10\%$ del valore iniziale. Non si sono osservate interferenze su campioni con:

- bilirubina totale fino a 40 mg/dL;

- acido ascorbico fino a 50 mg/dL.

Precisione nella serie: determinata su 20 replicati di due campioni

I risultati ottenuti sono i seguenti:

Campione	Media (U/L) $\pm 2s$	CV%
Umano 1	388 ± 4	0.6
Umano 2	246 ± 2	0.5

Precisione tra le serie: determinata per 5 giorni su 20 replicati al giorno per due campioni.

I risultati ottenuti sono i seguenti:

Campione	Media (U/L) $\pm 2s$	CV%
Umano 1	389 ± 5	0.7
Umano 2	245 ± 5	1.1

Accuratezza: un gruppo di 20 sieri è stato testato con questa procedura ed usando un reagente simile disponibile in commercio. Il confronto ha dato i seguenti risultati:

Regressione lineare $y = 0.9904x + 0.007$

Coefficiente di correlazione $r = 0.9987$ $n = 20$

XIV. BIBLIOGRAFIA

- Textbook of Clinical Chemistry, Ed. by N.W. Tietz, W.B. Saunders Co., Philadelphia (1999).
- Young D.S., Effect of drugs on Clinical Lab. Test, 5th Ed. AACC Press (2000).
- CLSI(NCCLS) GP44-A4/H18-A4: Proc. for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Lab. Tests.

 IVD	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	 Limiti di temperatura	 LOT	Codice del lotto (AXXX)	 Fabbricante
 Consultare le istruzioni per l'uso		 Utilizzare entro (anno/mese)	 REF	Numero di catalogo	 Non riutilizzare
 Fragile, maneggiare con cura		 Tenere lontano dal calore	 Mantenere asciutto	 NON STERILE	Non sterile

L-LACTIC ACID

For *in Vitro* Diagnostic use only

L-LACTIC ACID QUANTITATIVE UV ASSAY on PLASMA, URINE and LIQUOR with MINDRAY BS-300

 Σ (488 tests (5 x 20 mL))

REF NALA8810

I. INTENDED USE

L-lactic acid, and its salt lactate, are carboxylic acid that plays a role in various biochemical processes. L-lactate is constantly produced from pyruvate via lactate dehydrogenase (LDH) during normal metabolism and exercise. It does not increase in concentration until the rate of lactate production exceeds the rate of lactate removal, which is governed by a number of factors, including monocarboxylate transporters, concentration and isoform of LDH, and oxidative capacity of tissues.

The increased lactate produced can be removed in a number of ways, including:

-oxidation to pyruvate by well-oxygenated muscle cells; it is then directly used to fuel the Krebs cycle.

-conversion to glucose via gluconeogenesis in the liver and release back into the circulation. If not released, the glucose can be used to build up the liver's glycogen stores if they are empty.

Lactate, and not glucose, is preferentially metabolized by neurons in the brain; the glial cells are responsible for transforming glucose into lactate, and for providing lactate to the neurons.

The role of lactate for brain metabolism seems to be even more important at early stages of development (prenatal and early postnatal), with lactate at these stages having higher concentrations in body liquids.

Pathological lactate production occurs when there is inadequate tissue oxygen supply, or if there is defective pyruvate clearance or increased pyruvate production. Type A lactic acidosis occurs when there is obvious tissue hypoxia and Type B when tissue hypoxia is not apparent. Hypoxia is by far the most common cause of lactic acidosis and can occur with shock from any cause. Other factors which may cause tissue hypoxia include severe asthma, severe anaemia and carbon monoxide or cyanide poisoning.

II. PRINCIPLE

The L-Lactic acid is changed in pyruvate by L-LDH (lactate dehydrogenase) in the presence of NAD. This reaction is helped by a secondary one, who transforms the pyruvate originated before in the presence of L-glutamate and GPT (glutamate-pyruvate transaminase).

The intensity of the UV-colour at this wavelength is proportional to the concentration of L-Lactic acid in the tested sample.

III. PRECAUTION FOR USE

1. This product has been formulated for *in vitro* diagnostic use.

2. A proportional variation of the reaction volumes does not change the result.

3. DO NOT mix Reagents from different Production lots.

4. For concentration of L-Lactic Acid higher than 400 mg/L (4.44 mmol/L), dilute the sample 1:4 with saline solution, repeat the determination and multiply the result by 4.

5. In addition to the possible risk indications, the Reagent can contain preservatives (as sodium azide or others), which total concentration is lower than the limits mentioned in Dir. 67/548/CEE e 88/379/CEE and following modifications regarding classification, labelling and packaging of dangerous preparations (Reagents). However it is recommended to handle the reagents carefully, avoiding ingestion and contact with eyes, mucous membranes and skin; to use reagents according to good laboratory practice. On the material safety data sheet are detailed the operating procedures for the manipulation of this product. Material safety data sheet should be supplied on request.

ATTENTION!

A) Applications on routine analyzers may be totally different from what developed as manual determination; in addition the procedures are specific for each analyzer.

B) Very deep attention must be given to interfering substances: certain drugs and other substances are able to influence levels of L-Lactic Acid (see References 2).

C) The reagent must be used ONLY for the intended destinations, by expert and trained people and in according to good laboratory practice.

D) The clinical diagnosis cannot be done correctly using the result of only one test, but have to be done integrating critically the results of different laboratory tests and clinical data.

E) A lot of factors, as ambient temperature, the working reagent temperature, wash accuracy and the type of spectrophotometer, may affect the tests performances.

F) The R1 - BUFFER is supplied in surplus

G) The calibration curve has to be always repeated at each change of the lot of the Reagent and/or calibrator.

H) All the precautions normally used in the laboratory must be respected for reagents handling.

All the calibrators and controls must be considered as human sample, so potentially infectious; all the protection actions must be applied to avoid any potential biological risk.

IV. REAGENTS AND MATERIALS PROVIDED

Components of the kit:

	NALA8810
R1 - BUFFER	3 x 70 mL
Good buffer	> 10 mmol/L
R2 - NAD, LDH	5 x 20 mL
Glutamic acid	> 3 mmol/L
NAD	> 0.4 mmol/L
LDH	> 300 U/L
R3 - GPT (ALAT)	1 x 2.5 mL
(READY TO USE)	
GPT(ALAT)	> 20 U/L
NaN ₃	< 0.1%

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Normal laboratory equipment.

Micropipettes to deliver from 3 to 1000 μ L.

Disposable micropipettes tips.

Transparent glass tubes for sample dilution.

Calibrators and Controls

Spectrophotometer or automatic analyser for Clinical Chemistry.



AUXILIARY REAGENTS FOR QUALITY CONTROL

To grant the right performances use following kits (see the relative information for use (IFU)):

- SUBSTRATE ELEVATED CONTROL Iyo

REF OG3005

- SUBSTRATE LOW CONTROL Iyo

REF OG3006

The calibration curve has to be always repeated at each change of the lot of the Reagent and/or calibrator.

V. STORAGE AND STABILITY

the Reagents are stable up to the expiry date mentioned on the labels, stored at 2-8°C, if closed and kept in their intact primary container; if not exposed to heat sources and/or pressure variations.

In case of damaging of the primary container organize the waste disposal.

VI. PREPARATION OF THE WORKING REAGENT

Dissolve a vial of **R2 - NAD, LDH** with 20 mL of **R1 - BUFFER**, mix gently avoid foaming.

Let the reagent reach the room temperature before use.

Close immediately after handling.

The Reagents have to be used correctly, to avoid contamination.

An incompetent handling relieves us from any responsibility.

VII. STABILITY OF THE WORKING REAGENT

The working reagent is stable 1 day at 2-8°C.

VIII. SAMPLES

- Not haemolysed and not lipemic fresh plasma, ONLY with NaF;
- Urine;
- Liquor (CSF).

Use limpid samples; If necessary, filter the samples.

Use samples at neutral pH; neutralize the Acidic Samples at a neutral pH (max pH ≤ 8.0).

Samples collection in compliance with CLSI (NCCLS) (see References 3).

The sample can be stored at 2-8°C, up to 6 days. (see References 1).

IX. WASTE DISPOSAL

Observe all federal, state and local environmental regulations for waste disposal.

X. ANALYTICAL PROCEDURE ON MANUAL SPECTROPHOTOMETER

- Wavelength: 340 nm (334 - 365 nm)
- Pathlength: 1 cm
- Reading: against air or distilled water
- Temperature: 37°C
- Method: end point
- Reaction: 8 - 16 minutes
- Sample/reagent: 1/40/1

Let reagents reach the working temperature before use.

Pipette in a test tube or cuvette so labelled: R/B: Reagent Blank, S: Sample

	R/B	S
WORKING REAGENT	1000 µL	1000 µL
Distilled water	25 µL	----
Sample	----	25 µL

Mix and incubate for about 3 minutes at 37°C. Measure the absorbance AS1, and AR/B1. Then add:

R3 - GPT (ALAT)	25 µL	25 µL
------------------------	-------	-------

Mix carefully, incubate at 37°C and wait the end of the reaction (5-10 min.). Read AS2, and AR/B2.

Calculate for the sample $AS = (AS2 - AS1)$;

Calculate for the Reagent/Blank $AR/B = (AR/B2 - AR/B1)$.

Calculate the difference $\Delta AS = AS - AR/B$.

ATTENTION!

The kit is tested for a manual spectrophotometer and for HITACHI, COBAS and MINDRAY systems. The applications on automatic analysers could be completely different by what has been developed as manual determination.

XI. REFERENCE VALUES FOR WHOLE BLOOD (see References 1)

Normal Values L-Lactic acid:

Plasma Venous 4.5-19.8 mg/dL (0.5-2.2 mmol/L)

Arterial 4.5-14.4 mg/dL (0.5-1.6 mmol/L)

Urine 496-1982 mg/24 h (5,5 - 22 mmol/24 h)

CFS Adult 10 - 22 mg/dL (1,1 - 2,4 mmol/L)

Since the normal values depend on age, sex, diet, geographic area and other factors, each laboratory should establish its own normal values for this procedure.

XII. CALCULATION

Use this general formula to calculate the concentration:

$$\text{L-Lactic conc. (g/L)} = V/v \times 1/\epsilon d \times MW/1000 \times \Delta A$$

V = total test volume = 1.050 mL

v = sample volume = 0.025 mL

d = pathlength = 1 cm

ϵ = molar coeff. NADH = 6.3 L / mmol x cm



MW = lactic acid MW = 90.1

so it becomes:

$$\text{L-Lactic acid conc. (g/L)} = 0.601 \times \Delta A$$

XIII. ANALYTICAL PERFORMANCES (Validate on MINDRAY BS300)

The performances of the Reagent **L-LACTIC ACID** have been tested with a MINDRAY BS300 analyzer. The data, while representing the characteristics of the product, could be different for each laboratory and for different analyzers.

Method Limitations: are not know limitations.

Method Linearity: the test is linear up to 400 mg/L

(2.44 mmol/L). For concentrations \geq 400 mg/L (2.44 mmol/L), it is recommended to dilute the sample 1:4 with saline solution, test again and multiply the result x 4.

Method Sensitivity (LoD): the sensitivity limit, that is the minimum concentration that can be distinguished by zero, is 2 mg/L (0.02 mmol/L).

Interferences: see References 2.

Interference test criterion: recovery \pm 10% of initial value. No interference found on samples with:

- total bilirubin up to 40 mg/dL;
- ascorbic acid up to 50 mg/dL.

Within-run Precision: determined on 20 replications of 2 samples.

The results obtained are following:

Sample	Mean (U/L) \pm 2s	CV %
Human 1	388 \pm 4	0.6
Human 2	246 \pm 2	0.5

Run-to-run Precision: determined for 5 days with 20 replications for each days, for two samples.

The results obtained are the following:













Sample	Mean (U/L) \pm 2s	CV %
Human 1	389 \pm 5	0.7
Human 2	245 \pm 5	1.1

Accuracy: a group of 20 sera has been tested using this procedure and using a similar reagent available on the market. The comparison gave these results:

Linear regression equation $y = 0.9904x + 0.007$

Correlation coefficient $r = 0.9987$ $n = 20$

XIV. REFERENCES (see Italian version)

	In Vitro Diagnostic Medical Device		Temperature limitation		Batch code (Axxx)		Manufacturer
	Consult instructions for use		Use by (year/month)		Catalogue number		Do not reuse
	Keep dry		Non-sterile		Fragile, handle with care		Keep away from heat

EDMA (EDMS) CODE 1102011800

