

PYRUVATE

DETERMINAZIONE QUANTITATIVA UV del PIRUVATO (ACIDO PIRUVICO) su SANGUE INTERO
con SPETTROFOTOMETRO MANUALE HP8452A



100 tests (10 x 10 mL)

REF

NAPY8825

DESTINAZIONE D'USO

Il piruvato (acido piruvico) è un intermedio chiave nelle vie metaboliche cellulari. Il piruvato è principalmente derivato dal glucosio via glicolisi.

Nel caso sia disponibile sufficiente ossigeno, il piruvato viene convertito dalla piruvato deidrogenasi in acetil-CoA, che entra nel ciclo dell'acido citrico (ciclo di Krebs), dove viene metabolizzato per produrre ATP.

Il piruvato può anche essere convertito in carboidrati via gluconeogenesi o in acidi grassi via acetil-CoA. Negli ultimi anni, il piruvato è stato usato come un supplemento della dieta per aiutare la perdita di peso. Il piruvato può migliorare la capacità di resistenza all'esercizio fisico; effettivamente riduce il colesterolo e serve come un potente antiossidante. Pertanto la misura della concentrazione del piruvato può dare informazioni preziose al progresso di specifiche reazioni biochimiche. Il rapporto lattato piruvato riflette lo stato ossidoriduttivo della cellula e descrive il bilancio tra NAD ed NADH, che è dipendente dalla interconversione del lattato e del piruvato per mezzo della lattato deidrogenasi (LDH). Questo rapporto è stato usato per valutare la severità della insufficienza circolatoria così come di altri stati di malattia. Anormali valori incrementati di piruvato sono riportati in diverse malattie, come nello shock, nelle malattie del fegato, nella insufficienza cardiaca congestizia, nei disordini neoplastici, nella distrofia muscolare, nel diabete mellito, nella carenza di tiamina e nei disordini metabolici.

PRINCIPIO

La lattato deidrogenasi (LDH) catalizza la riduzione del piruvato a lattato con simultanea ossidazione del NADH a NAD.

Il decremento di assorbanza del NADH, è direttamente proporzionale alla concentrazione del piruvato nel campione.

Usando lo standard contenuto nel kit è possibile preparare una curva di calibrazione a cui fare riferimento. Riportando sulla medesima i valori di assorbanza e le concentrazioni dei singoli punti, si possono determinare le concentrazioni dei singoli campioni.

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 Piruvato maggiori di 4.1 mg/dL (0.460 mmol/L), diluire il campione 1:2 con soluzione fisiologica, ristare e moltiplicare il risultato x 2.
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) Elevata attenzione deve essere data alle sostanze interferenti: alcuni farmaci ed altre sostanze potrebbero influenzare i livelli od il dosaggio di Piruvato (cfr Bibliografia 2).

B) Il Reagente deve essere impiegato SOLO per l'uso indicato, da personale esperto e addestrato, seguendo le norme della buona pratica di laboratorio.

C) 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.

D) 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.

E) Il R1 - BUFFER è fornito in eccesso.

F) La preparazione del reagente di lavoro e la procedura per la calibrazione sono diverse da quelle per i campioni e controlli.

G) I controlli e I campioni devono subire il processo di deproteinizzazione prima di essere testate.

H) R4 - **CAL** è uno standard pronto all'uso. Non deproteinizzare!

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

J) 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.

REAGENTI

Composizione del kit:

R1 - BUFFER	REF NAPY8825
Good buffer > 400 mmol/L	3 x 70 mL
R2 - NADH	10 x 10 mL
LDH >250 KU/L	
R3 - LDH (PRONTO ALL'USO)	1 x 5 mL
NADH >0,1 mmol/L	
Attivatori, Stabilizzatori	
R4 - CAL (PRONTO ALL'USO)	1 x 10 mL
Soluzione di Piruvato = 4.0 mg/dL (= 0.450 mmol/L)	
Na ₃ < 0.1%	

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.



REAGENTI AUSILIARI PER IL CONTROLLO QUALITÀ

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

- SUBSTRATE ELEVATED CONTROL Iyo
- SUBSTRATE LOW CONTROL Iyo

REF OG3005
REF OG3006

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

PREPARAZIONE REAGENTE CALIBRAZIONE (SOLO PER CALIBRAZIONE)

Dissolvere un vial di **R2 - NADH** con 10 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 solleva da ogni responsabilità.

STABILITÀ REAGENTE PER CALIBRAZIONE (SOLO PER CALIBRAZIONE)

Il **REAGENTE PER CALIBRAZIONE** è stabile 7 giorni a 2-8 °C.

PREPARAZIONE DEL REAGENTE DI LAVORO (SOLO PER CONTROLLI E SANGUE INTERO)

Dissolvere un vial di **R2 - NADH** con 5 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 solleva da ogni responsabilità.

STABILITÀ DEL REAGENTE DI LAVORO (SOLO PER CONTROLLI E SANGUE INTERO)

Il **REAGENTE DI LAVORO** è stabile 7 giorni a 2-8 °C.

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, acqua distillata, Controlli.

Acido Perclorico 70%.

Spettrofotometro.

CAMPIONI

- Sangue intero.

Raccolta dei campioni in accordo con CLSI (NCCLS)

(cfr Bibliografia 3).

Per la stabilità dei campioni vedere il seguente paragrafo

PRETRATTAMENTI DEI CAMPIONI

Preparare surnatanti privi di proteine come segue :

- prelevare SANGUE seguendo la procedura standardizzata; è preferibile che il paziente sia a digiuno e a riposo;

- in tubo da centrifuga mettere 4.0 mL di acido perclorico freddo 8% (p/v)(PCA) (preparato diluendo 7 mL di acido perclorico 70% (p/p) in 100 mL di acqua distillata);

- pipettare velocemente 2.0 mL di SANGUE nel tubo e vortexare la miscela per 30 secondi;

- conservare al freddo la miscela di sangue precipitato ancora per

5 minuti, per assicurare la completa precipitazione delle proteine;
- centrifugare per 10 minuti a 1500 g.

- il surnatante limpido di PCA è pronto per l'uso.

NOTE: - Può rendersi necessaria una seconda centrifugazione del surnatante per ottenere una soluzione limpida priva di Proteine ;

- tutte le operazioni richiedono un tempo breve; il Piruvato in PCA è stabile per alcune settimane se refrigerato.

SMALTIMENTO DEI MATERIALI

Per lo smaltimento dei rifiuti attenersi alle regolamentazioni locali vigenti.

PROCEDURA ANALITICA DI CALIBRAZIONE su SPETTROFOTOMETRO MANUALE

- Lunghezza d'onda: 340 nm (334-365 nm)
- Cammino ottico: 1 cm
- Lettura: contro acqua distillata
- Temperatura: 37 °C
- Metodo : end-point
- Reazione: 5 + 5 minuti

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

Pipettare nelle provette o nelle cuvette così etichettate:

Cuvetta n°	Reagente calibratore	Acqua distillata	R4 - CAL	PIRUVATO nel SANGUE (mg/dL) (mmol/L)	
1	1000 µl	1900 µl	100 µl	0.600	0.068
2	1000 µl	1800 µl	200 µl	1.200	0.136
3	1000 µl	1700 µl	300 µl	1.800	0.204
4	1000 µl	1600 µl	400 µl	2.400	0.272
5	1000 µl	1500 µl	500 µl	3.000	0.340

Miscelare gentilmente e incubare per 5 minuti a 37 °C.

Leggere la prima volta l'assorbanza del campione (As1) contro Acqua (Abs INIZIALE). Immediatamente dopo aggiungere alle **5 cuvette**:

R3 - LDH	50 µl
----------	-------

Miscelare gentilmente. Esattamente 5 minuti dopo la prima lettura, fare la seconda lettura del campione (As2) (Abs FINALE).

PROCEDURA ANALITICA PER CAMPIONI E CONTROLLI su SPETTROFOTOMETRO MANUALE

- Lunghezza d'onda: 340 nm (334-365 nm)
- Cammino ottico: 1 cm
- Lettura: contro acqua distillata
- Temperatura: 37 °C
- Metodo : end-point
- Reazione: 5 + 5 minuti
- Rapporto campione/reagente: 4/1/1/0.1

Pipettare nelle provette o nelle cuvette così etichettate:

S: Campione:

	S
PCA surnatante fluido (dalla deproteinizzazione del campione)	2000 µl
R1 - BUFFER	500 µl

Miscelare gentilmente, la miscela dovrebbe essere al giusto pH **prima di aggiungere** IL REAGENTE DI LAVORO. Incubare per 5 min. 37 °C e aggiungere:

REAGENTE DI LAVORO	500 µl
--------------------	--------



Leggere per la prima volta l'assorbanza del campione (As1) contro acqua (abs INIZIALE). Immediatamente dopo aggiungere:

R3 - LDH	50 µl
-----------------	-------

Miscelare gentilmente. Esattamente 5 min. dopo la prima lettura, fare la seconda lettura del campione (As2) (abs FINALE).

VALORI DI RIFERIMENTO (cfr Bibliografia 1)

Valori normali Acido Piruvico: 0.3 - 0.9 mg/dL (0.034 - 0.102 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.

CALCOLO

Interpolare ogni valore trovato sulla curva di calibrazione. La curva di calibrazione va ripetuta per ogni nuovo lotto di reagenti; oppure

$(As1 - As2) \times 6.396 = \text{mg/dL di acido piruvico}$

$(As1 - As2) \times 0.726 = \text{mmol/L di acido piruvico}$

Acido piruvico in mmol/L = $0.1135 \times \text{mg/dL acido piruvico}$

PRESTAZIONI ANALITICHE

(validate su SPETTROFOTOMETRO HP8452A)

Le prestazioni del Reagente **PYRUVATE** sono state sperimentate con uno spettrofotometro HP8452A. 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 4.1 mg/dL

(0.460 mmol/L). Per concentrazioni ≥ 4.1 mg/dL (0.460 mmol/L), diluire il campione 1:2 con soluzione salina, ripetere la determinazione e moltiplicare il risultato x 2.

Sensibilità del metodo (LoD) : il limite di sensibilità, ovvero la concentrazione minima che può essere distinta dallo zero è 0 mg/dL (0.00 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;
- emoglobina fino a 600 mg/dL;
- lipemia [Intralipid®] fino a 4000 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 (mmol/L) $\pm 2s$	CV%
Umano 1	0.18 \pm 0.02	5.9
Umano 2	0.34 \pm 0.04	6.6

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

I risultati ottenuti sono i seguenti:

Campione	Media (mmol/L) $\pm 2s$	CV%
Umano 1	0.18 \pm 0.02	7.1
Umano 2	0.34 \pm 0.02	2.4

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 $y = 1.1252x - 0.034$

Coefficiente di correlazione $r = 0.9908$ $n = 20$

BIBLIOGRAFIA

1. Textbook of Clinical Chemistry, Ed. by N.W. Tietz, W.B. Saunders Co., Philadelphia (1999).

2. Young D.S., Effect of drugs on Clinical Lab. Test, 5th Ed. AACC Press (2000).

3. CLSI(NCCLS) GP44-A4/H18-A4: Proc. for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Lab. Tests.

CND W01010226



PYRUVATE

PYRUVATE (PYRUVIC ACID) QUANTITATIVE UV ASSAY on WHOLE BLOOD
with MANUAL SPECTROPHOTOMETER HP8452A



100 tests (10 x 10 mL)

REF NAPY8825

INTENDED USE

Pyruvate (pyruvic acid) is a key intermediate in cellular metabolic pathways. Pyruvate is primarily derived from glucose via glycolysis. In the case that sufficient oxygen is available, pyruvate is converted by pyruvate dehydrogenase into acetyl-CoA, which enters the citric acid cycle (Krebs cycle), where it is metabolized to produce ATP.

Pyruvate can also be converted into carbohydrates via gluconeogenesis or into fatty acids through acetyl-CoA.

In the last years, pyruvate has been used as a dietary supplement to aid in weight loss. Pyruvate can improve exercise endurance capacity, effectively reduces cholesterol and serves as a potent antioxidant. Therefore the measurement of pyruvate concentration can give valuable information to the progress of specific biochemical reactions.

The lactate to pyruvate ratio reflects the redox state of the cell and describe the balance between NAD and NADH, which is dependent on the interconversion of lactate and pyruvate by lactate dehydrogenase (LDH).

This ratio has been used to assess the severity of circulatory failure as well as other disease states.

Abnormal increase of blood pyruvate levels are reported in a number of disorders, as shock, liver disease, congestive heart failure, neoplastic disorders, muscular dystrophy, diabetes mellitus, thiamine deficiency and metabolic disorders.

PRINCIPLE

The Lactate Dehydrogenase (LDH) catalyzes the reduction of pyruvate to lactate with simultaneous oxidation of NADH to NAD. The decrease of absorbance of NADH, is directly proportional to the pyruvate concentration in the sample.

Using the standard contained in the kit it is possible to prepare a Calibration Curve to refer.

Plotting on the Calibration Curve absorbance values and concentration for each single sample, may be determined the concentration of each sample.

PRECAUTIONS 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 Pyruvate higher than 4.1 mg/dL (0.460 mmol/L), dilute the sample 1:2 with saline solution, repeat the determination and multiply the result by 2.
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) Very deep attention must be given to interfering substances: certain drugs and other substances are able to influence levels of Pyruvate (see References 2).

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

C) 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.

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

E) The **R1 - BUFFER** is supplied in surplus.

F) The preparation of working reagent and the procedure for calibration are different from those for samples and controls.

G) Controls and samples will be deproteinized before the test.

H) **R4 - CAL** is a standard ready to use. Do not deproteinized!

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

J) 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.

REAGENTS

Components of the kit:

R1 - BUFFER		REF NAPY8825
Good buffer	> 400 mmol/L	3 x 70 mL
R2 - NADH		10 x 10 mL
LDH	>250 KU/L	
R3 - LDH (READY TO USE)		1 x 5 mL
NADH	>0,1 mmol/L	
Activators, Stabilizers		
R4 - CAL (READY TO USE)		1 x 10 mL
Solution of Pyruvate = 4.0 mg/dL (= 0.450 mmol/L)		
Na ₃ N < 0.1%		

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.

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.

PREPARATION OF THE REAGENT FOR CALIBRATION (ONLY FOR CALIBRATION)

Dissolve a vial of **R2 - NADH** with 10 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.

STABILITY OF THE REAGENT FOR CALIBRATION (ONLY FOR CALIBRATION)

The **REAGENT FOR CALIBRATION** is stable 7 days at 2-8°C.

PREPARATION OF THE WORKING REAGENT (ONLY FOR CONTROLS AND SAMPLES)

Dissolve a vial of **R2 - NADH** with 5 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.

STABILITY OF THE WORKING REAGENT (ONLY FOR CONTROLS AND SAMPLES)

The **WORKING REAGENT** is stable 7 days at 2-8°C.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Normal laboratory equipment.
 Micropipettes to deliver from 3 to 1000 µL.
 Disposable micropipettes tips .
 Transparent glass tubes for sample dilution.
 Saline solution, distilled water, Controls.
 Perchloric acid 70%.
 Spectrophotometer.

SAMPLES

• Whole blood.
 Samples collection in compliance with CLSI (NCCLS) (see References 3).
 For samples stability, see the following paragraph.

SAMPLES PRETREATMENT

Prepare protein-free supernatants as follows:
 - draw **BLOOD** following standardized procedure: It is preferable that the patient be in a fasting and resting state;
 - into a centrifuge tube put 4.0 mL of cold 8% (w/v) perchloric acid (PCA) (prepared by diluting 7 mL of 70% (w/w) perchloric acid to 100 mL with distilled water);
 - quick pipet 2.0 mL **BLOOD** into that tube and vortex mix for 30 seconds ;
 - keep cold the blood-precipitate mixture again for 5 minutes, to assure complete protein precipitation;
 - centrifuge for about 10 minutes x 1500 g. ;
 - the clear PCA supernatant is ready for use.

NOTE: - a second centrifugation of the supernatant may be necessary to obtain a clear protein-free solution;
 - all the operation must require a short time; pyruvate in PCA is stable for a few weeks refrigerated.

WASTE DISPOSAL

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

ANALYTICAL PROCEDURE FOR CALIBRATION 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: 5 + 5 minutes

Let reagents reach the working temperature before use.

Pipette in a test tube or cuvette so labelled:

Cuvet n°	Reagent for Calibration	Distilled water	R4 - CAL	BLOOD PYRUVATE (mg/dL)	(mmol/L)
1	1000 µl	1900 µl	100 µl	0.600	0.068
2	1000 µl	1800 µl	200 µl	1.200	0.136
3	1000 µl	1700 µl	300 µl	1.800	0.204
4	1000 µl	1600 µl	400 µl	2.400	0.272
5	1000 µl	1500 µl	500 µl	3.000	0.340

Mix kindly and incubate for 5 minutes at 37°C.

Read for the first time the absorbance of sample (As1) against Water (INITIAL Abs). Immediately after this one, add to the 5 cuvetts:

R3 - LDH	50 µl
-----------------	--------------

Mix kindly. Exactly 5 minutes after the first reading, make the second reading of sample (As2) (FINAL Abs).

ANALYTICAL PROCEDURE FOR SAMPLES AND CONTROLS 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: 5 + 5 minutes
- Sample/reagent: 4/1/1/0.1

Let reagents reach the working temperature before use.

Pipette in a test tube or cuvet so labelled :

S: Sample:

	S
PCA supernatant fluid (from sample deproteinization)	2000 µl
R1 - BUFFER	500 µl

Mix kindly but surely: the mixture must be at the right pH before adding **WORKING REAGENT**. Incubate for 5 minutes x 37°C and add:

WORKING REAGENT	500 µl
------------------------	--------

Read for the first time the absorbance of sample (As1) against Water (INITIAL Abs). Immediately after this one, add:



R3 - LDH	50 µl
-----------------	-------

Mix kindly. Exactly 5 min. after the first reading, make the second reading of sample (As2) (FINAL Abs).

REFERENCE VALUES (see References 1)

Normal Values Pyruvic Acid 0.3 - 0.9 mg/dL (0.034 - 0.102 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.

CALCULATION

Plot each value found on the Calibration Curve. The Calibration Curve has to be always repeated for each new lot of Reagent;

or

$(As1 - As2) \times 6.396 = \text{mg/dL of Pyruvic Acid}$

$(As1 - As2) \times 0.726 = \text{mmol/L of Pyruvic Acid}$

Pyruvic Acid in mmol/L = $0.1135 \times \text{mg/dL of Pyruvic Acid}$

ANALYTICAL PERFORMANCES

(validate on SPECTROPHOTOMETER HP8452A)

The performances of the Reagent **PYRUVATE** have been tested with a spectrophotometer HP8452A. The data, while representing the characteristics of the product, could be different for each laboratory and for different analysers.

Method Limitations: are not know limitations.

Method Linearity: the test is linear up to 4.1 mg/dL

(0.460 mmol/L). For concentrations ≥ 4.1 mg/dL (0.460 mmol/L) it is recommended to dilute the sample 1:2 with saline solution, test again and multiply the result $\times 2$.

Method Sensitivity (LoD): the sensitivity limit, that is the minimum concentration that can be distinguished by zero, is 0 mg/dL (0.00 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 10 mg/dL;
- haemoglobin up to 600 mg/dL,
- lipemia [Intralipid ®] up to 4000 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 (mmol/L) $\pm 2s$	CV %
Human 1	0.18 \pm 0.02	5.9
Human 2	0.34 \pm 0.04	6.6

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 (mmol/L) $\pm 2s$	CV %
Human 1	0.18 \pm 0.02	7.1
Human 2	0.34 \pm 0.02	2.4

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 $y = 1.1252x - 0.034$

Correlation coefficient $r = 0.9908$ $n = 20$

REFERENCES

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

