



[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU
UTLÄGNINGSSKRIFT 58943**

C (45) Patenti myöntetty 11 05 1981
Patent meddelat

(51) Kv.itk.³/Int.Cl.³ C 12 Q 1/32

SUOMI-FINLAND

(FI)

**Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen**

(21) Patentihakemus — Patentansöknings	752550
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	11.09.75
(23) Aikupäivä — Giltighetsdag	11.09.75
(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig	13.03.76
(44) Nähtävöispanon ja kuulijulkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utskriften publicerad	30.01.81
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet	12.09.74

Saksan Liittotasavalta-Föbundsrepubliken
Tyskland(DE) P 2443741.0-52

- (71) Kommanditgesellschaft Schwarzaupt, Sachsenring 37-47, D-5 Köln 1,
Saksan Liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE)
- (72) Walther Lamprecht, Isernhagen, Saksan Liittotasavalta-Föbundsrepubliken
Tyskland(DE)
- (74) Berggren Oy Ab
- (54) Menetelmä laktaattidehydrogenaasin isoentsyymien 4 ja 5 samanaikaiseksi
tai erilliseksi määrittämiseksi - Förfarande för samtidig eller enskild
bestämning av laktatdehydrogenasernas isoensymer

Esillä oleva keksintö koskee menetelmää laktaattidehydrogenaasin
(LDH) isoentsyymien samanaikaiseksi määrittämiseksi saattamalla lak-
taatti ja nikotiiniamidini-adeniini-dinukleotidi (NAD⁺) reagoimaan kes-
kenään pyruvaatiksi.

On tunnettua, että laktaattidehydrogenaasi, jota tavallisesti nimitetään nimellä LDH, esiintyy viitenä isomuotona. Erillisten isoentsyymien aktiviteettimäärityksissä ovat erilaiset substraatti- ja pH-optimit tärkeitä tunnusmerkkejä, jotka eivät kuitenkaan yksittäisten isoentsyymien suhteen ole toistaiseksi täysin tunnettuja.

Kaikkien isoentsyymien määrittämiseksi on tähän asti joko isoentsyymit erotettu elektroforeettisesti (vertaa esim. "Die Isoenzyme der Laktatdehydrogenase", sarja Biochemie und Klinik, S.L. Kowalewski, G. Thieme Verlag, Stuttgart 1972, sivu 29), tai koko LDH-määrä pidetty liuoksessa, LDH-2 - LDH-5 sidottu ja määritetty yleisimmin esiintyvä LDH-1. Katsaus senaikaisiin standardi käsittelymenetelmiin on esitetty

mm. kirjassa "Enzymatische Analyse". osa I, Verlag Chemie, Weinheim 1970, sivu 557. Sen mukaisesti ehdotetaan käytettäväksi laktaatin muuttamiseksi pyruvaatiksi sellaista pH-optimia, joka on välillä 8,3 ja 8,9. Tosiasiallisesti käytetään kaikissa tunnetuissa määräysmenetelmissä emäksistä tai korkeintaan noin neutraalia pH-alueetta, jotta määrittäminen käsittäisi isoentsyymit mahdollisimman täydellisesti.

Lamprecht ym. (Cardiology 56: 371-375 (1971/72) ja Fortschritte der Klinische Chemie, Enzyme und Hormone, Verlag der Wiener medizinischen Akademie 1972, s. 277-283, toteavat, että erilliset isoentsyymit voivat muuttua toisiksi pH-arvon muutoksen johdosta, so. tapahtuu konformaatiomuutos.

Esillä olevan keksinnön tarkoituksena on poistaa tunnetuissa menetelmissä esiintyvät monimutkaiset erotusvaiheet ja jatkuvasti esiintyvät kokonaismäärityksen epätarkkuudet ja aikaansaada optimaalinen LDH-isoentsyymien yhteismääritys, erikoisesti isoentsyymien 4 ja/tai 5, mutta myös isoentsyymien 3 määritys. Keksintö koskee edelleen reagenssiyhdistelmää ja menetelmän spesifisiä käyttömahdollisuuksia.

Olemme todenneet, että pH-arvon alentaminen neutraalipisteen alapuolelle sinänsä tunnetussa laktaatin ja NAD:n reaktiossa pyruvaatiksi, aikaansaa optimaalisen kaikkien LDH-isoentsyymien toteamisen, mutta varsinkin isoentsyymien 4 ja 5 toteamisen. Tällöin on ennen kaikkea mielenkiintoista se, että ainoastaan suoritettaessa mittaus happamalla pH-alueella voidaan LDH 4 ja 5 todeta täydellisesti. Tällöin optimoidaan LDH:n todettujen isoentsyymien kokonaismäärä suorittamalla mittaus happamalla alueella ja on mahdollista todeta täydellisesti LDH 4 tai 5 erikseen tai seoksena toistensa kanssa tai myös täydellisesti muiden LDH-isoentsyymien kanssa.

Keksinnön kohteena on täten menetelmä laktaattidehydrogenaasin (LDH) useampien tai kaikkien isoentsyymien samanaikaiseksi määritykseksi, erikoisesti isoentsyymien 4 ja 5 sekä pelkästään isoentsyymien 5 määrittämiseksi, saattamalla laktaatti ja nikotiiniamidi-adeniini-dinukleotidi (NAD^+) reagoimaan keskenään pyruvaatiksi, jolle menetelmälle on tunnusomaista, mitä päävaatimuksessa esitetään.

Reaktiossa riittää vähäinen nestemäärä, mutta se toteutetaan kuitenkin tarkoituksenmukaisesti juoksevassa väliaineessa.

Edelleen on nimittäin todettu, että useampien isoentsyymien yhteismäärityksen optimi riippuu myös puskurista. Useimpia puskureita käytettäessä on tämä optimi pH-alueella noin 6-6,5. Fosfaattipuskuria käytettäessä on sitävastoin esim. isoentsyymin 5 optimi pH-arvossa 7,9. Hapan pH-arvo soveltuu kuitenkin huomattavasti paremmin useampien isoentsyymien yhteismääritykseen. Erikoisesti soveltuu pH-alue 6,3-6,4 LDH 4 ja LDH 5 yhteismääritykseen, jotka voivat esiintyä esim. vaginaalinessessä.

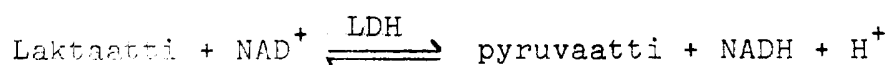
Reaktioväliaineeseen aikaansaadaan edullisesti suuri puskurikapasiteetti. Tällä on se etu, että tutkittaessa kehon nesteitä käyttäen huomattavasti pH-arvosta 6 poikkeavaa pH-arvoa ei optimi pH-arvoa reaktion avulla aliteta eikä ylitetä.

Reaktio tapahtuu sinänsä tunnetulla tavalla lämpötilassa noin 37°C. Tällöin säädetään koentsyymimäärät siten, että ne riittävät optimaalisesti kaikille esiintyville isoentsyymeille, mikä riittävyys voidaan, seuraavassa esiintulevat seikat huomioonottaen, määrittää muutamien rutiinikokeiden avulla.

LDH-määritys on erittäin tärkeä erikoisesti kehon nesteitä tutkittaessa. Kun näitä isoentsyymejä voidaan todeta terveillä ihmisillä pääasiallisesti kudoksissa, esiintyy niitä epänormaalissa kudokasvussa tai leukemiassa tai sentapaisissa sairauksissa huomattavissa väkyyksissä seerumissa tai muissa kehon nesteissä. Erikoisesti voidaan todeta, että patologisissa muutoksissa niitä sisältyy emätinnesteseen naisten alemmissa sulkupuolielimissä.

Keksinnön mukainen määritysmenetelmä soveltuu käytettäväksi kaikissa kehon nesteissä. Tutkittavan näytteen pH-arvon säätö riippuu näytteen omasta pH-arvosta. Joka tapauksessa tulee itse reaktiota varten pH-arvon olla alueella 6,3-6,4 ja erikoisesti noin 6,3. Reagenssin koostumus määrityksen suorittamiseksi on säädettävä tämän mukaisesti.

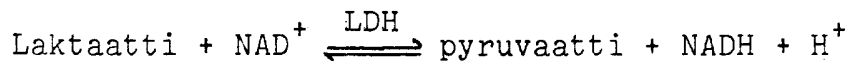
Kun tavanomaisissa menetelmissä (vertaa Enzymatische Analyse, osa I edellä) pH-arvon optimiksi on esitetty arvoa välillä 8,3 ja 8,9, poiketaan keksinnön mukaisesti tietoisesti tästä pH-alueesta. Edellä kuvatun emäksisen pH-alueen toteamisen perusteena on katsottava olevan sen, että reaktiossa



syntyy yksi protoni stökiometrisessä suhteessa laktaatti-reaktioon nähden, LDH:n tämän tasapainon siirtämiseksi oikealle toimitaan alkalisella alueella.

Keksinnön mukaisesti sitävastoin puskuroidaan esim. määritettäessä seerumista tai plasmasta saatu tutkittava näyte trietanoliamiini-NaOH:n avulla pH-arvoon 6,3-6,4 ja myös tutkimuksessa käytettävä tutkimusyhdistelmä (tutkimusreagenssi) säädetään tähän arvoon. Yleisesti sanoen suoritetaan säätö pH-arvoon 6,0-6,5 ja puskuroidaan siten, että itse määräyksessä esiintyy pH-arvo 6,3-6,4. Seerumialbumiiniin lisätään sinänsä tunnetulla tavalla glutationia.

Laktaattidehydrogenaasin isoentsyymit voidaan todeta optimaalisesti pH-arvossa 6,3-6,4 kun pidetään huolta siitä, että reaktiotasapaino, jolla on kaava



siirtyy peräkkäisten reaktioiden kautta oikealle. Tämän aikaansaamiseksi lisätään fenatsiinimetosulfaattia, jonka avulla koentsyymi NADH hapetetaan jatkuvasti uudelleen. Mittaus pH-alueella 6,0-6,5 tarjoaa ensimmäisen kerran mahdollisuuden todeta LDH 5 täydellisesti. Tämä on ennen kaikkea mielenkiintoista sen johdosta, koska LDH 5:n esiintyminen on indiisio syövän esiintymisestä ja täten sen tarkka ja herkkä mittaus mahdollistaa syövän varhaistoteamisen.

Määrättyjä kehon nesteitä käytettäessä ovat kuitenkin edellä kuvatut suhteet sikäli toisenlaisia, että niillä on huomattavasti pH-alueesta 6,3-6,4 poikkeava oma pH-arvo. Tällainen kehon neste on erikoisesti emätinneste, jonka pH-arvo on noin 4. Tällöin on säädettävä käytetyn koeyhdistelmän avulla reaktiolle optimaalinen pH-arvo, mikä merkitsee sitä, että koeyhdistelmällä on suurempi pH-arvo, joka sitten on säädettävä emätinnesteen pH-arvon avulla alueelle noin 6-6,5.

Täten keksintö koskee keksinnön erään toisen toteuttamismuodon mukaisesti sellaista koeyhdistelmää, jonka muodostavat laktaatti, nikotiiniamidi-adeniini-dinukleotidi (NAD⁺) ja tetratsoliumsuola entsyymaattisen NAD-reaktion tekemiseksi näkyväksi, joka yhdistelmä on puskuroitu sellaiseen pH-arvoon, että varsinaisessa reaktiossa esiintyy tutkittavassa kehon nesteessä puskurispesifinen pH-arvo 6,3-6,4, esim.

käytettäessä trietanoliamiini-NaOH-puskuria tai muita happamalla alueella säädettäviä puskureita fosfaattipuskuria lukuunottamatta. Kuivapreparaattia käytettäessä on täten tämän pH-arvon esiinnyttävä preparaatin liuottamisen jälkeen. Sellainen pH-arvo, joka on noin 6,0-6,5, on suuruudeltaan sopiva.

Siinä erikoistapauksessa, että tutkitaan emätinnestettä, jonka alkuperäistä pH-arvoa ei ole muutettu, soveltuu erikoisesti sellainen määrittäminen, jossa käytetään trietanoliamiini-NaOH-puskuria, jolloin koe-yhdistelmä säädetään pH-arvoon 7,0, kun taas pH-arvoon 6,3-6,4 säädetyissä koenäytteissä myös koe-yhdistelmä säädetään tähän arvoon.

Täten keksintö koskee edelleen keksinnön mukaisen menetelmän ja keksinnön mukaisen koe-yhdistelmän käyttöä siinä erikoistapauksessa, että tutkitaan emätinnestettä emättimessä koemateriaalin avulla mahdollisen patologisen muutoksen toteamiseksi naisten alemmissa sukupuolieliimissä, jolloin koe-yhdistelmä on sovitettu sopivalle kantajalle, erikoisesti tamponille tai myös koeliuskalle, ja kastamalla emättimeen reaktio aikaansaadaan emättimessä olevien LDH-isoentsyymien kanssa pH-alueella noin 6,0-6,5, varsinkin 6,3-6,4.

Koe-yhdistelmän muodostaa liuos, jolla on seuraava koostumus.

	<u>Edullinen koeaine- määrä</u>	<u>Alempi ja ylempi raja-alue</u>
Trietanoliamiini-NaOH-puskuri, pH 7,0	5,0 mM	1,0 - 150 mM
Na-laktaatti (D,L-maitohapon natriumsuola)	67,5 mM	20 - 350 mM
Fenatsiinimetosulfaatti (PMS)	0,1 mM	0,01 - 1,0 mM
Nikotiiniamidi-adeniini-dinukleo- tidi (NAD ⁺)	1,5 mM	0,1 - 10 mM
Nitro-sini-tetratsoliumkloridi (NBT)	0,3 mM	0,01 - 1,5 mM

Tämä koe-yhdistelmä suojataan valolta ja levitetään sopivalle kantajalle, erikoisesti tamponille, ja tätä säilytetään valolta suojaten käyttöhetkeen saakka.

LDH:n esiintyminen emätinnesteessä osoitetaan siten, että noin 5-10 minuutin kuluessa tamponi saa sinisen värin. Tällöin tapahtuvat seuraavat reaktiot:

1. Laktaatti + NAD^+ $\xrightleftharpoons{\text{LDH}}$ pyruvaatti + $\text{NADH} + \text{H}^+$
2. $\text{NADH} + \text{fenatsiinimetosulfaatti} + \text{H}^+ \longrightarrow$
 $\text{NAD}^+ + \text{pelk. fenatsiinimetosulfaatti}$
3. Pelk. fenatsiinimetosulfaatti + nitro-sini-tetratsolium-
kloridi \longrightarrow formatsaani + fenatsiinimetosulfaatti.

Koska toinen ja myös kolmas laktaattisuolan muodostamiseksi kytketty reaktio aikaansaa muodostunutta, pelkistynyttä ko-entsyymiä, samoin kuin ensimmäinen reaktio, so. laktaattireaktion tasapaino siirtyy täten vielä voimakkaammin oikealle, tapahtuu puskuroitaessa koelius pH-arvoon 7,0 tamponin sovittamisen jälkeen tosiasiallinen reaktio pH-arvossa noin 6, erikoisesti 6,3-6,4. Tällöin osaa ottavat siihen optimaalisesti isoentsyymit, erikoisesti LDH-4 ja LDH-5, joita voi esiintyä emätinnesteen epänormaalisten muutosten johdosta.

Sellaisissa koeyhdistelmissä, joita on käytettävä emättimessä, on va-
littava puskuri, joka on stabiili ja kudosturvallinen. Tähän sovel-
tuu erikoisesti trietanoliamiini-NaOH-puskuri.

Koeyhdistelmä voidaan sovittaa käytetylle kantajalle, erikoisesti tamponille, millä hyvänsä sopivalla tavalla. On tunnettua, että täl-
laisten koeyhdistelmien käsittelyn on tapahduttava valolta suojaten
ja koeyhdistelmällä varustettua kantajaa on säilytettävä mahdolli-
simman tarkkaan valolta suojaten aina käyttöhetkeen saakka. Kaksi
edullista koeyhdistelmän lisäämismenetelmää tamponiin muodostaa edul-
lisen koeyhdistelmän noin 2 ml:n määrän ruiskuttaminen tai tamponin
pään kyllästäminen noin 3/4 cm:n matkalta myös noin 2 ml:lla koeyh-
distelmää ja tämän jälkeen seuraava tamponin kuivaaminen, erikoisesti
jäähdytyskuivaaminen. Koeyhdistelmä voidaan kuitenkin myös lisätä
ainoastaan vetonaruun, joka voidaan helposti poistaa myöhemmin tar-
peen mukaan tamponista. Erittäin edullinen on myös koeyhdistelmän li-
sääminen nauha- tai kudostuotoiseen puuvillatuotteeseen, joka on so-
vitettu tamponin sisään.

Koska käytettäessä patologisen muutoksen pikamääräystä naisten suku-
puolielinten alaosassa sovittamalla emättimeen koekappale, ei luon-
nollisestikaan tiedetä, kuinka paljon läsnä on emätinnestettä, ja
koska tämä määrä vaihtelee, samoin kuin emätinnesteen pH-arvo, ta-
pauksesta toiseen, on koeyhdistelmälle aikaansaatava suuri puskuri-

kapasiteetti niin, että varsinaisessa määräyksessä reaktiokohdassa aikaansaadaan pH-arvo 6-6,5, erikoisesti noin 6,3-6,4. Koska vetonarussa olevan koe yhdistelmän puskurikapasiteetti ei usein tällöin käytännössä ole riittävä, on tarkoituksenmukaista tällaisessa tapauksessa lisätä tamponiin suurempi määrä puskuriainetta niin, että riittävä puskuroimiskyky aikaansaadaan joka tapauksessa vetonaru lähinnä olevassa tamponin osassa.

Tällaista koe yhdistelmällä varustettua kantajaa ei ole välttämätöntä käyttää lääkärin toimesta, vaan jokainen nainen voi toteuttaa sen käytön itse. Siniseksi värjäytyminen 15-30 minuutin pituisen tamponin viipymisajan jälkeen emättimessä osoittaa patologisen muutosvaaran ja on varoitusmerkki lääkärintutkimusta varten.

Jos käytetty tamponi tai vetonaru tai nyöri varastoidaan, mikä erikoisesti silloin, kun lääkäri suorittaa tutkimuksen, voi olla tarpeen, tai silloin kun potilas haluaa lähettää tamponin lääkärille, on suoritettava käytetyn tamponin jälkikäsittely, ja erikoisesti hajuprobleemien välttämiseksi on tamponi desinfioitava ja aikaansaattava värjäyksen stabiloituminen, jotta se kestäisi pidempiä varastoimisaikoja. Edelleen on todettu, että tämä jälkikäsittely voidaan toteuttaa kastamalla tutkimukseen käytetty tamponi 20 %:seen "Paraloidi-liuokseen" (Paraloidia valmistaa toiminimi Merck, 20 %:nen toluoliliuos).

Kun tähänastiset menetelmät LDH-määritysten suorittamiseksi ovat olleet monimutkaisia laboratorionenetelmiä, joilla on sitäpaitsi edellä kuvatut haitat, on täten aikaansaatua mahdollisuus suorittaa nopea ja riittävä kvantitatiivinen määrittäminen määrättyissä käyttötarkoituksissa esim. käyttäen emätinnestettä kouluttamattoman käyttäjän toimesta. Tämä on erittäin tärkeätä kasvainpotilaiden kysymyksessä ollessa. Suurelta lukumäärältä kasvainpotilaita on kirjallisuuden perusteella tähän asti tutkittu 26 entsyymiä. LDH:lla on suurin diagnostinen herkkyys; seerumissa (ei eritteissä) on todettu 40-90 %:n suuruinen kasvu. Kasvaimen kysymyksessä ollessa soveltuu LDH:n sarjamääritys seerumissa jatkuvaan terapiavalvontaan. LDH:n kasvu ei tosin ole millään lailla tuumorispesifinen. Se osoittaa kuitenkin aina vakavan sairauden ja on yhdessä muiden tunnusmerkkien kanssa sopiva tukemaan oletettua tuumorin diagnoosia.

Esillä oleva edullinen koe yhdistelmä tamponeihin lisättynä kokeiltiin sarjatutkimusta käyttäen noin 100 terveellä naisella ja sellaisilla

potilailla, joilla oli sairautena Carcinoma colli uteri, Carcinoma corporis ja Carcinoma in situ. Parhaiden tulosten aikaansaamiseksi pidetään tamponia paikoillaan koetta suoritettaessa 15-30 min. Poistamisen jälkeen voidaan välittömästi todeta seuraavat muutokset:

ei värjäytymistä	negatiivinen
sinipunainen värjäytyminen	vielä negatiivinen
kirkkaansininen, jossa violetti värisävy	+
sininen	++
tummansininen	+++

Jos tapahtui sininen (++) tai tummansininen (+++) värjäytyminen, esiintyi kaikissa tapauksissa karsinoma, joka vastasi aina patologisia löytöjä. Tummansinisen värjäntymisen tapahtuessa voitiin melkein poikkeuksetta diganoosissa todeta muutosvyöhyke. Sinipunainen värjäytyminen esiintyi ainoastaan terveillä naisilla (myös raskailla naisilla aina 15. vuorokauteen saakka).

Määräysmenetelmä in vitro, myös esim. seerumin ja plasman tutkimus, suoritetaan sinänsä tunnetulla tavalla. Ainoa tarpeellinen muutos on puskurispesifisen pH-arvon säätö, esim. noin 6-6,5, tähän asti käytettyihin verrattuna, jotka ovat olleet voimakkaasti emäksisiä pH-arvoja niin, että tämän tarkempi kuvaaminen ei ole välttämätöntä. Absoluuttisen määräyksen toteuttamiseksi voidaan suorittaa värin muutoksen kalibrointi tavanomaisen LDH-kokeen yhteydessä. Kalibrointinäyte voidaan, samoin kuin tamponin säilömisessä yhteydessä on esitetty, säilöä värin suhteen jonkin aikaa.

Seuraavat esimerkit esittävät vielä kaksi mahdollisuutta lisätä koe yhdistelmä tamponille.

a) Kastamismenetelmä

Tavallisten hygienisten tamponien (esim. "o.b.", toiminimi Dr. Karl Hahn) ympärille kiedotaan tiiviisti 1 cm:n leveä Tesa-nauha niiden keskikohdalle vyömäisesti kerran tai kaksi kertaa. Tamponin vaippa avataan tamponin vastakkaiselta puolelta, jossa ulosvetolanka sijaitsee. Tällöin on tamponin sylinteripinta vapaana. Tavanomaisista reagenssilaseista, joiden tilavuus on 18 ml (DIN-muoto; Schott, Mainz) poistetaan pohjakansi. Täten saatuihin lasiputkiin sovitetaan tamponi siten, että toiselta puolen aukaistu tamponi nojaa pinnoiltaan ta-

somaisesti putkenpäiden suhteen. Poistolanka kiinnitetään putken toiseen päähän kiinnelaastarilla, Tesa-nauhalla tai senkaltaisella. Putken sivut avattuine tamponipäällysteineen kastetaan kohdassa 1) mainittuun liuokseen. Tamponia kohden annetaan imeytyä 2,0 ml liuosta. Liuoksen lisääminen ja kaikki kuvatut toimenpiteet, jotka tapahtuvat yhdessä koeliuosseoksen käytön kanssa, on toteutettava pimeässä monokromaattista valoa käyttäen (punaisella alueella oleva valo, "punavalo").

Tällä tavoin valmistettu tamponi sekä lasiputket jäädytyskuivataan (lyofilisoidaan) pimeässä. Kuivatut tamponit poistetaan putkista esim. poistonarun avulla ja niitä säilytetään jatkuvasti pimeässä pakattuna valoa läpäisemättömään paperiin tai folioon tai värjättyyn paperiin.

b) Injektiomenetelmät

Seuraavat toimenpiteet suoritetaan pimeässä kammiossa. 2 ml:n suihkun avulla injektoidaan 2,0 ml koekombinaatioliuosta 1) tamponiin. Tamponin vastakkaisella puolella, jossa sijaitsee vetonaru, pistetään injektioneula vaipan lävitse tamponiin ja neula johdetaan samalla hitaasti suihkuttaen pituussuunnassa aina tamponin toiseen päähän saakka. Näin on aikaansaatu se, että tamponi on kostutettu tasaisesti. Tämän jälkeen tamponit jäädytyskuivataan ja pakataan kohdassa a) kuvatulla tavalla ja varastoidaan.

Reagenssiseos voidaan periaatteessa sovittaa mille hyvänsä imukykyiselle kantajalle. Emätinnesteen määräämiseksi tai näytteen ottamiseksi emättimestä ovat läpinäkyvät foliot osoittautuneet erittäin tarkoituksenmukaisiksi, esim. selluloosa-asettaattifoliot, jollaisia käytetään elektroforeesis-tarkoituksissa, tai myös tuote "Parafilm M" (American Chemcompany). Sellaisissa kohdissa, joissa foliot joutuvat kosketuksiin LDH:n kanssa koetta suoritettaessa, tapahtuu värjäytyminen siniseksi. Tällaisilla folioilla on etuna se, että ne ovat mekaanisesti lujempia kuin suodatinpaperi ja voidaan lisäksi tehdä stabiilomista tai varastoimista varten täysin läpinäkyviksi. Tällöin pysyvän värin voimakkuus täysin muuttumattomana.

Selluloosa-asettaattifolioiden läpinäkyväksi tekevinä kylpyinä voidaan käyttää seuraavia:

- a) metanoli:jääetikka suhteessa 85:15,
- b) isobutanoli:dioksaani suhteessa 1:1 - 3:7,
- c) metyylietyyliketoni:dioksaani suhteessa 3:2,
- d) etikkaesteri:dioksaani suhteessa 3:2,
- e) metanoli:jääetikka:glyseriini suhteessa 87:12:1.

Parafilmifolioita varten soveltuu lyhyt kastaminen 7,5 %:seen etikka-happoliuokseen.

Voidaan myös suorittaa öljykäsittely. Tällöin soveltuvat käytettäväksi "Whitemore-Oil 120" tai "Ondino-Oil 17" (Shell).

Näitä folioita, joiden pinta on 1,5-2,0 cm², voidaan tarkoituksenmukaisesti käyttää lääkärin toimesta oletetun limakalvon muutoksen kolposkooppiseen tutkimukseen emättimessä. Sellaisissa paikoissa, joissa esiintyy solupintoja, joissa on tuumori, tapahtuu paikoittaisesti värjäytyminen samalla tavoin kuin tamponissa.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä laktaattidehydrogenaasiaktiivisuuden määrittämiseksi emättimen eritteessä kantajan, edullisesti tamponin, avulla, johon on pantu koostumusta, joka sisältää laktaatti NAD:tä (nikotiiniamidi-adeniini-dinukleotidi), PMS:a (fenatsiinimetosulfaatti), tetratsoliumsuolaa ja puskuria, t u n n e t t u siitä, että puskuria käytetään sellaisessa määrin, että se kykenee muuttamaan kantajan absorboiman eritemäärän pH:n 6-6,5:ksi, edullisesti 6,3-6,4:ksi, jolla tavalla isoentsyymien, erityisesti LDH-4:n ja LDH-5:n ja jos-sain määrin LDH-3:n aktiivisuus rekisteröidään kantajan siniseksi värjäytymisen muodossa.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että määrittäminen toteutetaan trietanoliamiini-NaOH-puskuri-järjestelmässä pH-arvossa 6-6,5, erikoisesti 6,3-6,4.
3. Kantajalle, edullisesti tamponille, tuotu reagenssi kaikkien tai useiden laktaattidehydrogenaasin isoentsyymien määrittämiseksi patenttivaatimuksen 1 mukaisesti, t u n n e t t u siitä, että se koostuu laktaatista, nikotiiniamidi-adeniini-dinukleotidista, PMS:stä, ja tetratsoliumsuolasta, joka tekee entsyymattisen NAD-pelkistyksen näkyväksi, sekä puskurista, joka varmistaa, että reaktio laktaattidehydrogenaasin kanssa tapahtuu pH-arvossa 6-6,5, edullisesti arvossa 6,3-6,4.
4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen reagenssi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää puskurina trietanoliamiini-NaOH:ta.
5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen reagenssi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää
1,0-150 mM trietanoliamiinipuskuria, pH 7,0,
20-350 mM Na-laktaattia (DL-maitohapon natriumsuola),
0,01-1,0 mM fenatsiinimetosulfaattia (PMS),
0,1-10 mM nikotiiniamidi-adeniini-dinukleotidia (NAD⁺), ja
0,01-1,5 mM nitro-sininen-tetratsoliumkloridia (NBT).
6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen reagenssi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää
5,0 mM trietanoliamiinipuskuria, pH 7,0,
67,5 mM Na-laktaattia,

0,1 mM fenatsiinimetosulfaattia (PMS),
 1,5 mM nikotiiniamidi-adeniini-dinukleotidia (NAD^+), ja
 0,3 mM nitro-sininen-tetratsolium-kloridia (NBT).

Patentkrav

1. Sätt att bestämma laktatdehydrogenasaktiviteten i vaginalsekret medelst en på bärare, företrädesvis en tampong, anbragt komposition innefattande laktat NAD (nikotinamid-adenin-dinukleotid), PMS (fenazinmetosulfat), tetrazoliumsolt och en buffert, k ä n n e t e c k n a t av att bufferten användes i sådan mängd att den förmår bringa den av bäraren absorberade mängden sekret till ett pH-värde av 6-6,5, företrädesvis 6,3-6,4, varigenom aktiviteten för isoenzymerna, isynnerhet LDH-4 och LDH-5 och i någon mån LDH-3 registreras i form av en blåfärgning av bäraren.
2. Sätt enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t av att bestämningen sker i ett trietanolamin-NaOH-buffert-system vid pH 6-6,5, speciellt pH 6,3-6,4.
3. Reagens anbragt på bärare, företrädesvis tampong, för gemensam bestämning av alla eller flera isoenzym av laktatdehydrogenas enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t av att det består av laktat, nikotinamid-adenin-dinukleotid, PMS och ett tetrazoliumsolt som gör den enzymatiska NAD-reduktionen synlig, samt en buffert som säkerställer att reaktionen med laktatdehydrogenas sker vid ett pH-värde av 6-6,5 och isynnerhet 6,3-6,4.
4. Reagens enligt patentkravet 3, k ä n n e t e c k n a t av att det som buffert innehåller trietanolamin-NaOH.
5. Reagens enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k n a t av att det består av
 1,0-150 mM trietanolaminbuffert, pH 7,0
 20-350 mM Na-laktat (natriumsalt av DL-mjölksyra)
 0,01-1,0 mM fenazinmetosulfat (PMS)
 0,1-10 mM nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD^+) och
 0,01-1,5 mM nitroblå tetrazoliumklorid (NBT).
6. Reagens enligt patentkravet 5, k ä n n e t e c k n a t av

att det består av

5,0 mM trietanolaminbuffert, pH 7,0

67,5 mM Na-laktat

0,1 mM fenazinmetosulfat (PMS)

1,5 mM nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD⁺) och

0,3 mM nitroblå tetrazoliumklorid (NBT).

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Hakemusjulkaisuja:-Ansökningspublikationer: Saksan Liittotasavalta-Föbundsrepubliken Tyskland(DE) 2 061 984 (G 01 n 33/16).

Patenttijulkaisuja:-Patentskrifter: USA(US) 3 663 374 (G 01 n 31/14), 3 713 986 (C 12 k 1/04), 3 326 777 (195-103.5), 3 388 044 (195-103.5).