



Método UV optimizado (SFBC) para la determinación de lactato deshidrogenasa (LDH) en suero o plasma

SIGNIFICACION CLINICA

La determinación de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) tiene una gran variedad de aplicaciones clínicas. Por ser una enzima intracelular, su elevación es índice de daño tisular con la consecuente liberación de ésta a la circulación. El daño puede variar desde una simple anoxia con ligero daño celular y pérdida de citoplasma hasta necrosis celular severa generando diversos grados de elevación de la actividad enzimática.

En el infarto agudo de miocardio, la actividad de LDH total (junto con las CK y AST), constituye un elemento importante de diagnóstico. La misma comienza a elevarse 12-24 horas después de producido el infarto; alcanza un pico entre las 48-72 horas y permanece elevada hasta el séptimo o décimo día. También se registra un aumento de actividad de LDH total en pacientes con necrosis hepática (producida por agentes tóxicos o por infección aguda como la hepatitis viral) e incluso acompañando a necrosis tubular renal, pielonefritis, etc. En los tumores sanguíneos como leucemias y linfomas también se observan valores aumentados de la LDH.

En el líquido cefalorraquídeo (LCR) el valor normal es de aproximadamente el 10% de su valor en suero, aumentando marcadamente su valor en meningitis bacterianas. En las meningitis virales la LDH aumenta su valor solo en el 10% de los casos.

FUNDAMENTOS DEL METODO

Basado en el siguiente esquema de reacción:



Las concentraciones del ensayo están optimizadas de acuerdo a la Sociedad Francesa de Biología Clínica (SFBC).

REACTIVOS PROVISTOS

A. Reactivo A: solución de buffer Tris, pH 7,2 conteniendo piruvato y cloruro de sodio.

B. Reactivo B: solución conteniendo NADH.

Concentraciones finales (según SFBC)

Tris	80 mM, pH 7,2
Piruvato	1,6 mmol/l
NADH	0,2 mmol/l
ClNa	200 mmol/l

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Reactivos Provistos: listos para usar. Pueden usarse separados o como **Reactivo único**, mezclando 4 partes de Reactivo A con 1 parte de Reactivo B (ej.: 4 ml Reactivo A + 1 ml Reactivo B).

PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".

Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de análisis clínicos.

Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Reactivos Provistos: son estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. Una vez abiertos, no deben permanecer destapados y fuera del refrigerador durante lapsos prolongados. Evitar contaminaciones.

Reactivo único (premezclado): en refrigerador (2-10°C) es estable 1 mes a partir de la fecha de su preparación.

INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Cuando el espectrofotómetro ha sido llevado a cero con agua destilada, lecturas de absorbancia del Reactivo único premezclado inferiores a 0,800 D.O. o superiores a 1,800 D.O. (a 340 nm) son indicio de deterioro del mismo.

MUESTRA

Suero o plasma

a) Recolección: se debe obtener suero de la manera usual y separar del coágulo dentro de las dos horas de su obtención. También puede usarse plasma.

b) Aditivos: en caso de que la muestra a emplear sea plasma, debe usarse heparina como anticoagulante.

c) Sustancias interferentes conocidas: no se observan interferencias por triglicéridos hasta 570 mg/dl, bilirrubina hasta 18 mg/dl, hemoglobina hasta 180 mg/dl (en muestras con niveles normales de LDH) o hasta 350 mg/dl (en muestras con niveles elevados de LDH), ni heparina hasta 50 UI/ml. Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: la muestra debe ser preferentemente fresca. La LDH es estable hasta 24 horas en refrigerador. No congelar.

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Espectrofotómetro.
- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados.
- Material volumétrico adecuado.
- Baño de agua a la temperatura indicada en el procedimiento.
- Cronómetro.

CONDICIONES DE REACCION

(Disminución de absorbancia)

- Longitud de onda: 340 nm (Hg 334 ó 366)
- Temperatura de reacción: 25, 30 ó 37°C. Ver los VALORES DE REFERENCIA correspondientes a cada temperatura.
- Tiempo de reacción: 3 minutos y 30 segundos.

Los volúmenes de muestra y reactivo se pueden variar proporcionalmente sin que se alteren los factores de cálculo.

PROCEDIMIENTO

I- TECNICA CON REACTIVO UNICO

A) 30-37°C

En una cubeta mantenida a la temperatura de trabajo, colocar:

Reactivo único	1 ml
-----------------------	------

Preincubar unos minutos, luego agregar:

Muestra	20 ul
----------------	-------

Mezclar inmediatamente y disparar simultáneamente el cronómetro. Esperar 30 segundos. Leer la absorbancia inicial (ver LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO) y luego a los 1, 2 y 3 minutos de la primera lectura. Determinar la diferencia promedio de absorbancia/min ($\Delta A/\text{min}$), restando cada lectura de la anterior y promediando los valores. Utilizar este promedio para los cálculos.

B) 25°C

Emplear 100 ul de Muestra y 3 ml Reactivo único, siguiendo el procedimiento indicado en I-A).

II- TECNICA CON REACTIVOS SEPARADOS

A) 30-37°C

En una cubeta mantenida a la temperatura de trabajo, colocar:

Reactivo A	1 ml
-------------------	------

Muestra	20 ul
----------------	-------

Preincubar unos minutos, luego agregar:

Reactivo B	0,25 ml
-------------------	---------

Mezclar inmediatamente y disparar simultáneamente el cronómetro. Esperar 30 segundos. Leer la absorbancia inicial (ver LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO) y luego a los 1, 2 y 3 minutos de la primera lectura. Determinar la diferencia promedio de absorbancia/min ($\Delta A/\text{min}$), restando cada lectura de la anterior y promediando los valores. Utilizar este promedio para los cálculos.

B) 25°C

Emplear 3 ml de Reactivo A con 100 ul de Muestra y 0,75 ml de Reactivo B, siguiendo el procedimiento indicado en II-A).

CALCULO DE LOS RESULTADOS

$$\text{LDH (U/l)} = \Delta A/\text{min} \times \text{factor}$$

En cada caso deberá emplearse el factor de cálculo correspondiente de acuerdo a la temperatura de reacción seleccionada (30-37°C o 25°C) y a la técnica empleada (con Reactivo único o separados) como se indica en las siguientes tablas de factores:

TECNICA CON REACTIVO UNICO

Temperat. Long. onda	25°C	30-37°C
340 nm	4.921	8.095
334 nm	5.016	8.253
366 nm	9.118	15.000

TECNICA CON REACTIVOS SEPARADOS

Temperat. Long. onda	25°C	30-37°C
340 nm	6.111	10.080
334 nm	6.230	10.275
366 nm	11.324	18.675

METODO DE CONTROL DE CALIDAD

Procesar 2 niveles de un material de control de calidad (**Standatrol S-E 2 niveles**) con actividades conocidas de lactato deshidrogenasa, con cada determinación.

VALORES DE REFERENCIA

Temperatura	25°C	30°C	37°C
Valores (U/l)	120-240	160-320	230-460

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CONVERSION DE UNIDADES AL SISTEMA SI

$$\text{LDH (U/l)} \times 0,017 = \text{LDH (ukat/l)}$$

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA. Absorbancia inicial baja: cuando una vez agregado el suero, la primera lectura (tiempo 0) es inferior a 0,800 D.O. estando el Reactivo B en condiciones, indica una muestra con muy alta actividad de LDH (que consume NADH aún antes de esta lectura). En este caso, repetir la determinación con muestra diluida 1/10 con solución fisiológica y multiplicar el resultado por la dilución efectuada.

PERFORMANCE

a) Reproducibilidad: procesando simultáneamente replicas de una misma muestra, se obtienen los siguientes valores:

Nivel	D.S.	C.V.
439 U/l	± 3,64 U/l	0,8 %
919 U/l	± 11,41 U/l	1,2 %

b) Linealidad: el límite de linealidad es hasta 1000 U/l. Si la $\Delta A/\text{min}$ es superior a 0,120 D.O. (340-334 nm y 37°C), repetir la determinación con muestra diluida 1/5 ó 1/10 con solución fisiológica, corrigiendo consecuentemente los resultados.

c) Límite de cuantificación: la mínima actividad cuantificable de lactado deshidrogenasa es 24 U/l.

PARAMETROS PARA ANALIZADORES AUTOMATICOS

Para las instrucciones de programación consulte el manual del usuario del analizador en uso.

PRESENTACION

100 ml: - 4 x 20 ml Reactivo A
 - 1 x 20 ml Reactivo B
 (Cód. 1009267)

100 ml: - 4 x 20 ml Reactivo A
 - 1 x 20 ml Reactivo B
 (Cód. 1521304)

125 ml: - 5 x 20 ml Reactivo A
 - 2 x 12,5 ml Reactivo B
 (Cód. 1009315)


150 ml: - 2 x 60 ml Reactivo A
 - 2 x 15 ml Reactivo B
 (Cód. 1009626)

BIBLIOGRAFIA

- Societé Française de Biologie Clinique (SFBC) - Ann. Biol. Clin. 40:160, 1982.
- Sociedad Española de Química Clínica - Comité Científico, Comisión de Enzimas - Quim. Clin. 57-61, 1989.
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4th ed., 2001.

SIMBOLOS


Los siguientes símbolos se utilizan en todos los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab.


 Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"

 Representante autorizado en la Comunidad Europea

 Uso diagnóstico "in vitro"


 Contenido suficiente para <n> ensayos


 Fecha de caducidad

 Límite de temperatura (conservar a)

 No congelar

 Riesgo biológico


 Volumen después de la reconstitución

 Contenido


 Número de lote


 Elaborado por:

 Nocivo

 Corrosivo / Caústico

 Irritante

 Consultar instrucciones de uso


 Calibrador

 Control

 Control Positivo

 Control Negativo

 Número de catálogo

 Wiener Laboratorios S.A.I.C.
 Riobamba 2944
 2000 - Rosario - Argentina
<http://www.wiener-lab.com.ar>
 Dir. Téc.: Viviana E. Cétola
 Bioquímica
 Producto Autorizado A.N.M.A.T.
 Cert. N°: 4356/01



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina