

DESHIDROGENASA LÁCTICA (LDH-L)

Uso:

Para la determinación cinética cuantitativa in vitro de la actividad lactato deshidrogenasa en suero.

Introducción:

La enzima lactato deshidrogenasa (LDH-L) se distribuye en los tejidos particularmente en el corazón, los músculos, el hígado y el riñón. La enzima que se encuentra en la circulación es una mezcla de cinco isoenzimas basada en su movilidad. Niveles elevados séricos de LDH-L se encuentran en el suero en el infarto de miocardio, enfermedad hepática, enfermedad renal, ciertas formas de anemia, enfermedades malignas, y la distrofia muscular progresiva.^{1,2}

LDH cataliza la reacción siguiente:



La actividad de la enzima LDH-L puede ser medida en ambas direcciones. Usando las condiciones óptimas para ambas direcciones y teniendo en cuenta las variaciones de isoenzimas, análisis en cualquier dirección se consideran equivalentes.³ Sin embargo, el método de lactato a piruvato ofrece una serie de ventajas⁴ (1) la tasa de reacción es lineal en un amplio rango (2) no se requiere ninguna pre-incubación y (3) una mejor estabilidad de los reactivos.

Principio:

LDH cataliza la oxidación del lactato a piruvato en presencia de NAD, que posteriormente se reduce a NADH. La velocidad de formación de NADH medido a 340 nm es directamente proporcional a la actividad del LDH-L en suero.

Composición del Reactivo:

Después de combinar R1 y R2 como se indica, el reactivo contiene: Lithium lactato 55 mmol/L; NAD 7.5 mmol/L; Buffer (8.95), y estabilizantes y conservantes.

Precauciones:

1. Para uso de diagnóstico "in vitro" solamente.
2. El reactivo contiene azida de sodio como conservante. No ingerir. Evitar contacto con la piel y ojos.
3. Todas las muestras y controles deben ser manejados como potencialmente infecciosos, utilice procedimientos de laboratorios seguros. (NCCLS M29-T2).

Preparación del Reactivo:

El reactivo de trabajo se prepara mediante la mezcla de cinco (5) volúmenes de R1 con un (1) volumen de R2 en un recipiente desechable.

Ejemplo: 25ml R1 + 5ml R2

Almacenaje del Reactivo:

1. Almacenar el reactivo a 2-8°C.
2. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad si son almacenados como indicado.
3. El reactivo de trabajo es estable por 14 días a 2-8°C.
4. Proteja de la luz directa.
5. Evite la contaminación microbiana.

Deterioro del Reactivo:

1. Si el blanco de reactivo, antes de la adición de suero tiene una absorbancia que excede 0.600 a 340 nm, el reactivo puede haberse deteriorado.
2. La falta de obtener resultados precisos en el ensayo de materiales de control puede indicar deterioro de los reactivos.

Recolección y Manejo de la Muestra:

1. Suero con cualquier hemólisis visible no se puede utilizar debido a la contaminación de esta muestra con gran cantidad de LDH liberada por los eritrocitos.³
2. El suero debe ser separado del coágulo rápidamente.

3. Las muestras se deben analizar pronto después de la recogida. LDH en suero es estable durante dos o tres días a temperatura ambiente.²
4. El LDH hepático es particularmente frágil y se destruye si se congela y descongela.⁵

Interferencia:

1. Oxalato, oxamatos y EDTA inhibirán el LDH.
2. Young, et al. da una lista de drogas y otras sustancias que interfieren con la determinación de la actividad de LDH.⁶

Materiales Provistos:

Lactato Deshidrogenasa LS Buffer
Lactato Deshidrogenasa LS Co-Enzima

Materiales Necesarios, pero no Provistos:

1. Dispositivos de pipeteo precisos.
2. Tubos de ensayo y estante.
3. Reloj cronómetro.
4. Baño / bloque de calefacción (37°C).
5. Espectrofotómetro capaz de leer a 340 nm (UV).

Procedimiento Automatizado:

Consulte las instrucciones del instrumento para la aplicación adecuada.

Procedimiento Manual:

1. Prepare el reactivo de trabajo como se indica.
2. Pipetear 1.0 mL de reactivo en los tubos apropiados y precalentar durante cinco (5) minutos a 37°C.
3. Cero el espectrofotómetro con agua a 340 nm.
4. Agregue 0.025 mL (25 µL) de muestra al reactivo, mezclar e incubar a 37°C durante un (1) minuto.
5. Después de un (1) minuto, lea y registre la absorbancia y mantenga el tubo a 37°C. Repita la lectura cada minuto durante los próximos dos (2) minutos.
6. Calcular la diferencia promedio de absorbancia por minuto (Δ Abs. / Min.)
7. La absorbancia Abs. / Min. multiplicada por 6592 dará resultados en U/L.

Limitaciones:

Las muestras con valores superiores a 1.000 U/L se deben diluir 1:1 con solución salina, volverse a analizar y los resultados multiplicarse por dos (2) para compensar la dilución.

Calibración:

El procedimiento está estandarizado por medio de la capacidad de absorción milimolar del NADH que es 6.22 a 340 nm bajo las condiciones de prueba descritas.

Cálculos:

La actividad de Lactato Deshidrogenasa es expresada como U/L. Definición de unidad.: Una Unidad Internacional (U/L) es la cantidad de enzima que cataliza un micromol de NAD por minuto a una temperatura específica.

$$\text{IU/L} = \frac{\Delta \text{ Abs./min.} \times \text{TV} \times 1000}{d \times e \times \text{SV}} = \frac{\Delta \text{ Abs./min.} \times 1.025 \times 1000}{1.0 \times 6.22 \times 0.025} = \Delta \text{ Abs./min.} \times 6592$$

Dónde: Δ Abs./min = Promedio absorbancia por minuto.

TV = Volumen total de la reacción (1.025)

1000 = Conversión de U/ml a U/L.

D = Paso de luz en cm (1.0 cm)

ϵ = Absorción Millimolar de NADH (6.22)

SV = Volumen de muestra en ml (0.025)

Ejemplo: Si el Promedio de cambio en absorbancia por minuto es 0.022, Entonces; $0.022 \times 6592 = 145$ U/L

Control de Calidad:

Se recomienda que los controles se incluyan en cada serie de pruebas. Material de control comercialmente disponible con valores conocidos de LDH-L se pueden utilizar para el control de calidad. El valor asignado del material de control debe ser confirmado por la aplicación elegida. Si no se obtiene el rango apropiado de valores en el ensayo del material

de control puede indicar deterioro del reactivo, mal funcionamiento instrumento o errores de procedimiento.

Valores Esperados:

Hombres: 50-166 IU/L (30°C)
80-285 IU/L (37°C)

Mujeres: 60-132 IU/L (30°C)
103-227 IU/L (37°C)

Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango de referencia.

Características de Rendimiento:

1. Sensibilidad: Basado en un instrumento con resolución de 0.001 de absorbancia, este procedimiento tiene una sensibilidad de 3.4 U/L.
2. Linealidad: Lineal de 0-1,000 U/L.
3. Comparación: Un grupo de 54 sueros que van en los valores de lactato deshidrogenasa de 15 a 992 U/L se analizaron por este método y por un reactivo similar disponible comercialmente. La comparación de los resultados dio un coeficiente de correlación de 0.996 y la ecuación de regresión fue $y = 0.954x - 9.02$. (Los estudios de comparación se llevaron a cabo de acuerdo a NCCLS Directriz Provisional EP9-T).

4. Precisión:

Entre Corridas:

	Suero I	Suero II
Promedio (U/L)	90	185
Desviación Estándar (U/L)	3.37	2.32
C.V. (%)	3.74	1.19

Corrida a Corrida:

	Suero I	Suero II
Promedio (U/L)	90	194
Desviación Estándar (U/L)	1.7	1.05
C.V. (%)	1.88	0.53

Los estudios de precisión se realizaron de acuerdo a NCCLS Directriz Provisional, EP5-T.

Referencias:

1. Henry, J.B.: Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods W.B. Saunders and Company, Philadelphia, PA p. 365 (1979).
2. Tietz, R.W.: Fundamentals of Clinical Chemistry, W.B. Saunders and Company, Philadelphia, PA p. 652 (1976).
3. Henry, R. J. et al.: Clinical Chemistry Principles and Techniques, 2nd Ed., Harper and Row, Hagerstown (MD) p. 819-831 (1974).
4. Amador, E., et al.: Clinical Chemistry Acta 9-391 (1963).
5. Kreutzer, H.H., et al.: Clinical Chemistry Acta 9:64 (1964).
6. Young, D. S., et al.: Clinical Chemistry, 21: ID 432D (1975).

