

Determinazione quantitativa dell'attività dell'LDH (Lattico Deidrogenasi) nel siero o plasma. Metodo cinetico UV ottimizzato SFBC (substrato piruvato)

REF CC1252 R1:3x20 mL + R2: 1x15 mL

REF CC1250 R1:3x40 mL + R2: 1x30 mL

REF CC1254 R1: 3x80 mL + R2: 1x60 mL

PRINCIPIO DEL METODO

La Lattico Deidrogenasi (LDH) catalizza la trasformazione del Piruvato in L-Lattato con conseguente ossidazione del NADH in NAD⁺. Questo determina una diminuzione di Assorbanza (Abs) della reazione che è misurata fotometricamente alla lunghezza d'onda di 340 nm.

La velocità di diminuzione della Abs è proporzionale all'attività dell'enzima LDH nel campione in esame.

LDH

Piruvato + NADH + H⁺ -----> L-Lattato + NAD⁺ + H₂O

SIGNIFICATO CLINICO

LDH è un tetramero formato dalla combinazione di due diversi monomeri, codificati da due geni distinti: il tipo H (H dall'inglese heart), maggiormente presente nel cuore, e il tipo M (M dall'inglese muscle), caratteristico del muscolo scheletrico. Dalla diversa composizione monomerica, si hanno cinque forme isoenzimatiche: H4 o LDH1, H3M1 o LDH2, H2M2 o LDH3, H1M3 o LDH4, M4 o LDH5 che differiscono tra loro per composizione strutturale, proprietà biochimiche e diffusione tissutale.

- LDH1 (H4) è prevalente nel miocardio e nei globuli rossi. Presente anche nella corteccia renale e nel muscolo scheletrico.
- LDH2 (H3M1) è prevalente nel miocardio e nelle emazie, oltre ad essere presente nel pancreas, corteccia renale, polmone e muscolo scheletrico.
- LDH3 (H2M2) è presente in polmoni, placenta, muscolo scheletrico e pancreas.
- LDH4 (H1M3) si trova nella midollare renale, muscolo scheletrico, polmone e placenta.
- LDH5 (M4) è caratteristico del muscolo e del fegato. Presente anche nella midollare renale e nel pancreas.

Valori aumentati di LDH1 e LDH2 si riscontrano nell'infarto miocardico e nell'anemia emolitica. In particolare il livello di LDH1, a seguito di infarto del miocardio, raggiunge il picco dopo 48 h e rimane alterato per 1-3 settimane. LDH3 aumentato è in relazione con l'infarto polmonare mentre un maggiore quantitativo di LDH5 è caratteristico dell'epatite virale acuta.

Un livello di LDH totale maggiore della norma si riscontra in patologie come: infarto miocardico, infarto polmonare, epatite virale acuta, epatite tossica, stato di shock, anemia severa, distrofia muscolare, polimiosite, dermatomiosite, esercizio muscolare intenso, diabete, insufficienza renale, cirrosi epatica, sindrome di Reye, leucemia e neoplasie. Valori diminuiti si riscontrano in soggetti esposti a radiazioni ionizzanti.

COMPOSIZIONE DEI REAGENTI

Reagente R1:

Tampone Tris, pH 7,5	100 mmol/L
Piruvato	2,75 mmol/L

Reagente R2:

NADH	0,18 mmol/L
------	-------------

Reagenti liquidi e pronti all'uso, stabili fino alla data di scadenza riportata, se conservati come riportato in etichetta e si evitano contaminazione, evaporazioni ed esposizione prolungata alla luce diretta.

Non congelare i reagenti.

Scartare il reagente se appaiono segni di deterioramento come presenza di particelle e torbidità oppure mancato recupero dei valori di sieri di controllo certificati oppure se l'Assorbanza del Bianco Reagente a 340 nm è < 1.000 in cuvetta da 1 cm.

Dopo l'apertura dei flaconi, si consiglia di prelevare il volume necessario, di richiudere immediatamente i flaconi e di riportarli in frigo al fine di evitare contaminazione, degradazione da luce diretta ed evaporazione.

Per la procedura Campione Starter, preparare una Soluzione di Lavoro miscelando 4 parti di R1 ed 1 parte di R2 (per esempio 20 mL di R1 + 5 mL di R2). Stabilità: 5 gg a 15-25° C, 30 giorni a 2-8°C.

Per la Procedura Reagente Starter, i reagenti R1 ed R2 sono pronti all'uso e stabili fino alla data di scadenza riportata in etichetta se si evitano contaminazione, degradazione da luce diretta ed evaporazione

CAMPIONI

Siero, Plasma da eparina o EDTA. Non utilizzare campioni emolizzati o lipemici. Separare il siero dal coagulo nel più breve tempo possibile.

L'enzima nel siero è stabile per 8 ore a temperatura ambiente, 5 giorni a 2-8°C, e 3 mesi a -20°C

Scartare i campioni contaminati.

PROCEDURA

Lunghezza d'onda:	340 nm
Temperatura:	37°C
Misura:	contro acqua distillata

Procedimento come Monoreagente (Campione Starter).

Pipettare come segue:

Soluzione Lavoro	1000 µL
Campione /Calibratore	25 µL

Miscelare, attendere 1 minuto e leggere l'Assorbanza iniziale (Abs) e le Abs dopo 1,2 e 3 minuti esatti.

Calcolare i Δ Abs/minuto ed effettuare la media aritmetica.

Procedimento come bi-reagente (Reagente Starter).

Pipettare come segue:

Reagente R1	800 µL
Campione /Calibratore	25 µL

Miscelare, attendere 1 minuto, quindi aggiungere:

Reagente R2	200 µL
-------------	--------

Miscelare, attendere 1 minuto e leggere l'Assorbanza iniziale (Abs) e le Abs dopo 1,2 e 3 minuti esatti.

Calcolare i Δ Abs/minuto ed effettuare la media aritmetica

PREPARAZIONE REAGENTI E STABILITA'



CALCOLO

Con Fattore di Calcolo (lettura in cuvette di 1 cm di percorso ottico):

$$\text{LDH-P (U/L)} = \text{Media } \Delta \text{ Abs/minuto} \times 8199$$

Con Calibratore Multiparametrico:

Ricavare il Fattore di Calcolo dall'uso di un Calibratore Multiparametrico

$$\text{Fattore Calcolo} = \frac{\text{Concentrazione Calibratore}}{\text{Media } \Delta \text{ Abs/minuto Calibratore}}$$

$$\text{LDH-P (U/L)} = \text{Media } \Delta \text{ Abs/minuto} \times \text{Fattore Calcolo}$$

Fattore di conversione: $\text{U/L} \times 0,0167 = \mu\text{Kat/L} = \mu\text{mol/sec/L}$

CALIBRAZIONE

I risultati dipendono dalla accuratezza della calibrazione, dal corretto settaggio del test sullo strumento, dal giusto rapporto volumetrico reagente/campione e dalla corretta temperatura di analisi.

Usare il Calibratore **MTD Diagnostics:**

Chemistry Multicalibrator - REF CAL1010 (10 x 3 mL).

CONTROLLO QUALITA'

Sieri di controllo normali e patologici ad attività enzimatica nota, devono essere analizzati regolarmente in ogni seduta analitica.

Utilizzare il materiale di controllo di qualità di MTD Diagnostics:

Chemistry Control N - REF CNN1010 10x5 mL (Livello 1)

Chemistry Control P - REF CNP1020 10x5 mL (Livello 2)

VALORI DI RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICI

Adulti < 480 U/L

Ogni laboratorio dovrebbe stabilire un range di valori attesi in base alla propria popolazione di pazienti e, se necessario, determinare il proprio intervallo di riferimento. A fini diagnostici, i risultati devono sempre essere valutati insieme alla storia medica del paziente, all'esame clinico e ad altri risultati.

PRESTAZIONI

PRECISIONE:

Livello basso: Campioni= 20; Media = 495; D.S. = 4,32; CV = 0,87%

Livello alto: Campioni= 20; Media = 879; D.S. = 7,34; CV = 0,83%

ACCURATEZZA (CORRELAZIONE): Una comparazione tra questo metodo (x) ed un metodo certificato del commercio (y) ha dato la seguente correlazione:

$$y = 1.00x + 1.646 \quad ; \quad r = 0.999$$

SENSIBILITA': 20 U/L

LINEARITA': 20 – 1200 U/L

INTERFERENZA E SPECIFICITA'

Nessuna interferenza osservata con presenza di nei campioni di Bilirubina fino a 20 mg/dL e Trigliceridi fino a 1000 mg/dL. L'Emoglobina interferisce poiché LDH, contenuto ad alta concentrazione nelle emazie, viene da esse rilasciato in seguito ad emolisi.

NOTE

1. Questo metodo può essere utilizzato con diversi strumenti. Qualsiasi applicazione a uno strumento deve essere validata per dimostrare che i risultati soddisfano le caratteristiche di prestazione del metodo. Si consiglia di validare periodicamente lo strumento. Contattare il proprio distributore per qualsiasi domanda sul metodo di applicazione.

2. La diagnosi clinica non dovrebbe essere fatta sui risultati di un singolo risultato del test, ma dovrebbe integrare sia i dati clinici che quelli di laboratorio

PRECAUZIONI

Il prodotto non contiene altre sostanze o miscele pericolose secondo la regolamentazione CE n° 1272/2008 (CLP) ovvero le loro concentrazioni sono tali da non essere considerate persistenti, bioaccumulanti o tossiche (PBT). Pertanto, esso non è soggetto alla etichettatura speciale prevista dalla suddetta regolamentazione. Il prodotto è etichettato secondo la direttiva per la marcatura CE (98/79/CE). Sodio Azide inferiore a 0.1%.

Tuttavia, in osservanza alle normali norme di prudenza che ognuno deve osservare allorchè maneggi qualunque sostanza chimica o reagente di laboratorio, in caso di contatto dei Reagenti con l'operatore, occorre applicare i seguenti interventi di primo soccorso:

S26 (P305 – P351 – P338): In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare il medico.

S28 (P302 – P352): In caso di contatto con la pelle, lavarsi immediatamente ed abbondantemente.

S36/37/39 (P280): Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.

S46 (P301 – P310): In caso d'ingestione consultare immediatamente il medico e mostrargli il contenitore o l'etichetta. Se la vittima è cosciente, lavare la bocca con acqua.

S56 (P273): Smaltire questo materiale e relativi contenitori in un punto di raccolta autorizzato per rifiuti pericolosi o speciali.

S63 (P304 – P340): In caso di incidente per inalazione, allontanare l'infortunato dalla zona contaminata e mantenerlo a riposo.

Tutti i campioni in esame, calibratori e controlli devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo capace di trasmettere HIV ed epatiti

PER OGNI ALTRA INDICAZIONE, RICHIEDERE LA SCHEDA DI SICUREZZA AL PRODUTTORE.

SIMBOLOGIA

	Marchio CE (prodotto conforme ai requisiti della Dir. 98/79 CE)		
	Dispositivo medico diagnostico in vitro		Limiti temperatura di conservazione
	Consultare le istruzioni per l'uso		Dimensione / numero test
REF	Numero di catalogo		Scadenza
LOT	Numero di lotto		Fabbricante

BIBLIOGRAFIA

Commission Enzymologie de la Société Française de Biologie Clinique. Ann. Biol. Clin. 40: 123-128 (1982).

Young DS. Effects of drugs on clinical labo... 4th ed. AACC Press, 1995.

Tietz. N.W. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd Edition.

W.B. Saunders Co. Philadelphia, PA. (1995).