

Usò previsto

Determinazione cinetica quantitativa *in vitro* dell'attività della lattato deidrogenasi nel siero utilizzando gli analizzatori Yumizen C230 e Yumizen C240. Solo su prescrizione.

Interesse clinico

Livelli più elevati di LD sono associati all'infarto del miocardio. I valori raggiungono il picco massimo circa 48 ore dopo l'insorgenza del dolore e restano invariati per una decina di giorni. L'entità dell'innalzamento è utile per valutare la portata del danno ed elaborare una prognosi. Innalzamenti dei valori della LD si osservano anche nelle malattie epatiche, nell'anemia perniciosa, in alcune patologie renali e in alcuni traumi muscolari.¹

Storia del metodo diagnostico

Nel 1955 Wroblewski e Ladue² pubblicarono il primo metodo cinetico a raggi UV per la determinazione dell'attività della LDH nel siero. Il loro metodo si basava sul classico test di Kubowitz e Ott³ (1943) che utilizzava la reazione piruvato-lattato. Nel 1956, Wacker et al⁴ descrissero una procedura che seguiva la reazione lattato-piruvato. La reazione lattato-piruvato è diventata, benché più lenta la reazione di elezione⁵, per via di un intervallo lineare più ampio⁶ e dell'assenza di pre-incubazione⁷. Il metodo qui presentato segue la reazione diretta ed è stato ottimizzato per ottenere una maggiore sensibilità e linearità, come indicato da Gay et al.⁸

Principio

LD

L-lattato + NAD+ -----> piruvato + NADH + H+

La lattato deidrogenasi catalizza l'ossidazione del lattato in piruvato e la contemporanea riduzione del NAD a NADH. La velocità di riduzione del NAD può essere calcolata misurando l'aumento di assorbanza a 340nm. Questa velocità è direttamente proporzionale all'attività della LD nel siero.

Composizione dei reagenti

Dopo aver combinato R1 e R2, il reagente contiene: NAD 5,8 mM, L-lattato 55 mM, tampone pH 8,95. Stabilizzatori non reattivi e sodio azide (0,1%) come conservante.

Preparazione dei reagenti

I reagenti vengono forniti sotto forma di liquido pronto all'uso.

Conservazione e stabilità dei reagenti

Se conservati seguendo le raccomandazioni, i reagenti sono stabili fino alla data di scadenza. Tenere al riparo dalla luce. Evitare la contaminazione microbica.

Precauzioni

- Il reagente è destinato esclusivamente a fini diagnostici *in vitro*.
- Il reagente contiene sodio azide (0,1%) come conservante. Non ingerire. Evitare il contatto con occhi e pelle. Il sodio azide anche reagire con il piombo e il rame delle tubature e formare un complesso metallo-azide altamente esplosivo. Quando si smaltisce il reagente, sciacquare con grandi quantità d'acqua.
- Tutti i campioni e i controlli devono essere trattati secondo le buone pratiche di laboratorio, utilizzando opportune precauzioni descritte nel manuale CDC/NIH, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 2^a ed., 1988, HHS n. (CDC) 88-8395.

Raccolta e conservazione dei campioni

- Si raccomanda di raccogliere siero non emolizzato. I globuli rossi contengono grandi concentrazioni di LD.⁵
- Separare prontamente il siero non appena si forma il coagulo.
- I campioni vanno analizzati appena prelevati. A temperatura ambiente, la LD nel siero risulta stabile per due o tre giorni.⁹
- Non congelare o esporre il siero a temperature elevate (37°C), di potrebbero inattivare gli isoenzimi termolabili della LD.¹⁰
- La raccolta dei campioni deve essere effettuata secondo le indicazioni del documento NCCLS M29-T2.¹¹ Nessun metodo può offrire la totale certezza che i campioni di sangue umano non trasmettano infezioni. Pertanto, tutti i campioni devono essere considerati potenzialmente infettivi.

Interferenze

- Alcuni farmaci e alcune sostanze alterano l'attività dell'LD. Si veda Young, et al.¹²
- È stato riscontrato che livelli di bilirubina fino a 20 mg/dl producono un'interferenza trascurabile (≤ 5%) per questo esame.
- Si è visto che l'emolisi interferisce significativamente con il test anche a livelli inferiori a 100 mg/dl.

Materiali in dotazione

Reagente (R1), tampone per lattato deidrogenasi
 Reagente (R2), co-enzima per lattato deidrogenasi

Materiali necessari non in dotazione

- Analizzatori Yumizen C230 / Yumizen C240
- Manuale utente per gli analizzatori Yumizen C230 / Yumizen C240
- Controllo chimico Pointe, numero di catalogo C7592-100

Parametri di analisi

Analisi:	LDH	Sost.chim.: Lattato deidrogenasi
N. chim:	223	Nome etichetta: LDH
Tipo reazione:	cinetica	Direzione reazione: positiva
Lungh. d'onda prim.:	340 nm	Lungh. d'onda sec. 405 nm
Decimale:	0	Tipo campione: siero
T. bianco:		T. reazione: 3 11
Unità:	U/L	T. incubazione: 3

Vol. campione	Aspirato	Diluente	Vol. reagente	Diluente
Standard; 11	ul	ul	180	ul u
Decremento:	ul	ul	45	ul ul
Incremento:	ul	ul	ul	

Intervallo linearità (standard); 0-1000	Limite linearità: 0.3
Intervallo linearità (decremento):	Esaurim. substrato:25000
Intervallo linearità (incremento):	Assorb. bianco mix: -40000 40000
Assorb. bianco R1: -40000 40000	Stabilità in macchina: 30 Giorni
Risposta bianco -40000 40000	Limite allarme reagente: 5
Doppia chim.:	

Controllo eff. prozona:		
Q1:	Q2:	Q3:
Q4:	PC:	ABS:

Risultato qualitativo:	
Intervallo:	Val. fuori norma:

Pendenza Offset:			
Pendenza	Offset	Unità	
1	0	U/L	

Tratt. preliminare:			
Vol. campione pretratt.:	ul	Vol. reagente pretratt.:	ul

Intervallo rif.:					
Tipo campione:	Sesso:	Intervallo età:	Intervallo rif.:	Intervallo critico:	Unità:

Kit reagenti liquidi Lattato deidrogenasi Pointe

Parametri di configurazione della calibrazione

Analisi chim.	LDH	Calibratore	Conc.	Pos.	N. lotto:
Impostazioni calibr.		acqua	0,0	W	
Modello mat.: Fattore K					
Fattore: 3907.000	Repliche:				
2					
Limiti accettabilità					
T. calibr.: 24 h					
Diff. pendenza:	DS:				
Sensibilità:	Ripetibilità:				*Def. utente
Coeff. deter.:					
Calibr. autom.					
	T. calibr.				

Limitazioni

1. Il siero emolizzato può portare a valori falsamente elevati di LD nel siero.
2. I campioni che superano il limite di linearità (1000 U/L) vanno diluiti con pari volume di soluzione fisiologica e nuovamente analizzati. Moltiplicare i risultati per due per compensare la diluizione.

Calibrazione

La procedura è standardizzata mediante l'assorbività millimolare del NADH, considerata pari a 6,22 a 340nm nelle condizioni di analisi descritte.

Controllo qualità

La bontà della reazione va monitorata utilizzando sieri di controllo con valori normali e patologici noti di LD. I controlli vanno eseguiti in ogni turno in cui si effettuano dosaggi della LD. Si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca la frequenza interna dei controlli. Il controllo qualità richiesto va eseguito in conformità con le normative locali, statali e/o federali o ai requisiti di accreditamento.

Calcolo (esempio)

Un'unità internazionale (U/L) è definita come la quantità di enzima che catalizza la trasformazione di una micromole di substrato al minuto.

$$IU/L = \frac{(A_2 - A_1) \times 1.050 \times 1000}{1 \times 6,22 \times 0,050} = (A_2 - A_1) \times 3376$$

con:

(A₂-A₁) = variazione di assorbanza
 1,050 = volume di reazione totale in ml
 1000 = fattore di conversione da U/ml in U/l
 1 = percorso luce in cm
 6.22 = assorbività millimolare del NADH
 0,050 = volume del campione in ml

Esempio: Se la lettura iniziale (A₁) = 0,450
 la lettura finale (A₂) = 0,480
 (A₂-A₁) = 0,03
 allora 0,03 x 3376 = 101 U/L

Nota: Per trasformare in unità del SI (nkat/l), moltiplicare il valore in U/l per 16,76.

Valori attesi⁵

Uomini 50-166 U/L (30°C) 80-285 U/L (37°C)
 Donne 60-132 U/L (30°C) 103-227 U/L (37°C)

In considerazione dell'ampio ventaglio di condizioni (alimentari, geografiche, anagrafiche, ecc.) che si sa incidere sui range di riferimento, si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca il proprio intervallo di riferimento per la procedura.

Prestazioni

1. Saggio: 0-1000 U/L. I campioni che superano il limite di 1000 U/L devono essere diluiti con pari volume di soluzione fisiologica e nuovamente analizzati e i risultati vanno moltiplicati per 2.

2. Correlazione: È stato condotto uno studio comparativo tra l'impiego dell'analizzatore Yumizen serie 200 e di un analizzatore simile per l'applicazione del metodo. Si è ottenuto un coefficiente di correlazione di 0,999 e l'equazione di regressione $y = 1,013x + 4,1$.

3. Precisione: gli studi sulla precisione sono stati condotti applicando una modifica delle linee guida contenute nel documento EP5-T2 dell'istituto NCCLS.¹²

Intra saggio			Inter-giornaliera		
Media	D.S.	C.V.%	Media	D.S.	C.V.%
131,6	4,4	3,4	114,4	2,3	2,0
331,5	6,4	1,9	331,3	7,0	2,1

4. Sensibilità: La sensibilità del reagente liquido per LD è stata studiata leggendo la variazione dell'assorbanza a 340nm per un campione di soluzione fisiologica e per campioni di siero con attività nota della LD. Sono state eseguite dieci repliche per ogni campione. I risultati di questa indagine hanno indicato che, sull'analizzatore utilizzato, il reagente liquido per LD ha mostrato una deriva minima o nulla sul campione zero. Nelle condizioni di reazione descritte, una variazione dell'assorbanza di 0,0001 equivale approssimativamente a 1 U/L di attività LD.

Riferimenti bibliografici

1. Tietz, N.W., editor, Fundamentals of Clinical Chemistry, 3rd Ed., W.B. Saunders Co., 391 (1987).
2. Wroblewski, F., LaDue, J.S., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 90:210 (1955).
3. Kubowitz, F., Ott, P., Biochem. 314:94 (1943).
4. Wacker, W.E.C., et al, N. Engl. J. Med. 255:449 (1956).
5. Henry, R.J. et al, Clinical Chemistry; Principles and Technics, 2nd Ed., Hagerstown (MD) Harper & Row, pp. 819-831. (1974).
6. Amador, E., et al, Clin. Chem. 9:391 (1963).
7. Buhl, S.N., et al, Clin. Chem. 23:1289 (1977).
8. Gay, R.J., McComb, R.B., Bowers, G.N., Clinical Chemistry, 2nd Ed., W.B. Saunders Co., 657 (1976).
9. Tietz, N.W., Fundamentals of Clinical Chemistry, 2nd Ed., W.B. Saunders Co., 657, (1976).
10. Kreutzer, H.H., et al, Clin. Chim. Acta 9:64 (1964).
11. Documento NCCLS M29-T2, 2nd Ed. (1991).
12. Young, D.S., et al, Clin. Chem., 21: 1D (1975).
13. Documento NCCLS, "Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices", 2nd Ed. (1992).

Legenda

Utilizzare entro (aaaa-mm-gg)	LOT Codice lotto e gruppo
REF N. catalogo	F Fabbricante
IVD Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>	L Limiti di temperatura
Consultare il manuale utente	Rx Only: utilizzare solo su prescrizione
CE Marchio CE	EC REP Rappresentante autorizzato per la Comunità Europea

REF 12-L7572-100 Prodotto da HORIBA Instruments Incorporated - Pointe Brand 5449 Research Drive Canton, MI 48188

Prodotto da HORIBA Instruments Incorporated – Pointe Brand
 5449 Research Drive, Canton, MI 48188

Rappresentante autorizzato per l'Europa:
 Obelis s.a.
 Boulevard Général Wahis 53
 1030 Bruxelles, BELGIO
 tel: (32)2.732.59.54 fax:(32)2.732.60.03 email: mail@obelis.net



Reagenti certificati

I reagenti Pointe sono certificati per essere stati prodotti conformemente ai parametri specifici. Se entro la data di scadenza un reagente Pointe dovesse risultare non conforme alle specifiche, sarà prontamente sostituito senza alcun addebito.