

HISTORIA DEL METODO

En 1955 Wrobelsky y La Due publicaron el primer método cinético UV para la determinación de la actividad de LDH en suero. Su método estaba basado en el ensayo clásico de Kubowitz y Ott (1943) utilizando la reacción piruvato - lactato. En 1956 Wacker et. al. Describieron un método que seguía una reacción piruvato – lactato. La reacción piruvato – lactato se ha convertido en la reacción preferida, aunque es la más lenta de las 2, porque tiene un rango lineal más amplio y no requiere pre-incubación. El presente método sigue la reacción y ha sido optimizado para tener una mayor sensibilidad y linealidad.

PRINCIPIO



Lactato deshidrogenasa cataliza la oxidación de lactato a piruvato con reducción simultánea de NAD a NADH. La razón de reducción de NAD puede ser medida como un cambio de absorbancia a 340 nm. dicha razón es proporcional a la actividad de LDH en suero.

REACTIVOS

Después de combinar R1 y R2 el reactivo contiene: NAD 7.5 mM; L-Lactato 55 mM; Buffer pH 8.95; estabilizadores no reactivos; azida de sodio (0.1 %) como preservativo.

Para preparar reactivo de trabajo, se mezclan 5 partes de Buffer R1 y 1 parte de Coenzima R2.

Los reactivos por separado son estables hasta su fecha de caducidad si se guardan a 2-8 °C.

El reactivo de trabajo es estable 14 días a 2-8 °C.

Los reactivos deben protegerse de la luz solar y de contaminación microbiana.

INTERFERENCIAS

- Algunas drogas interfieren en la actividad de LDH.
- Se ha encontrado que bilirrubinas de por lo menos 30 mg/dL tienen un efecto insignificante en esta prueba.
- Las hemólisis interfieren significativamente con el ensayo a niveles más bajos de 100 mg / dL.

MATERIAL

Reactivos R1 Y R2 de LDH-L

Pipetas automatizadas

Cronómetro

Tubos de ensayo

Espectrofotómetro con capacidad de leer a 340 nm (UV)

Bloque térmico

Sueros control para LDH

PROCEDIMIENTO (AUTOMATIZADO GENERAL)

| | |
|--------------------------|-------------|
| Longitud de onda | 340 nm |
| Tipo de ensayo | cinético |
| Razón muestra/ reactivo | 1:21 |
| Dirección de la reacción | creciente |
| Temperatura | 37°C |
| Tiempo lag | 30segundos |
| Tiempo de lectura | 60 segundos |
| Valor normal bajo | 80 U/L |
| Valor normal alto | 285 U/L |

PROCEDIMIENTO (MANUAL)

1. Prepare el reactivo de acuerdo al instructivo
2. Pipetee 1 mL de reactivo de trabajo en cada tubo.
3. Pre-caliente por lo menos 5 minutos a 37 °C.
4. Agregue 50 μ L de suero a los tubos respectivos y mezcle. Incube todos los tubos a 37 °C por 30 segundos.
5. Después de 30 segundos lea y anote la absorbancia a 340 nm contra blanco de agua. Vuelva a hacer lecturas a los 60 segundos.
6. Calcule el cambio de absorbancia (A1-A2). Este cambio de absorbancia se multiplica por el factor 3376 y así se obtiene el resultado en U/L.

CALIBRACIÓN

El procedimiento está estandarizado por la media de la absorbividad de NADH tomada como 6.22 a 340 nm bajo las condiciones de prueba descritas.

LIMITACIONES

1. Sueros hemolizados falsas alteraciones en los niveles de LDH sérica.
2. Muestras con valor arriba de 500 UI/L deben ser diluidas 1:1 con solución salina, reensayadas, y el resultado se multiplica por 2.

CALCULOS

Una unidad internacional (UI/L) está definida como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micromol de sustrato por minuto bajo condiciones específicas.

$$\text{LDH (UI/L)} = \frac{\square\square\square\square\square\square\square\square * 1.050 * 1000}{6.22 * 0.050 * 1.0} = \square\square\square\square\square\square\square\square * 3376$$

donde :

$\square\square\square\square\square\square\square\square$ = cambio de absorbancia por minuto
1000 = conversión UI/mL a UI/L
1.050 = volumen total de reacción (mL)
6.22 = absorbividad molar de NADH
0.050 = volumen de muestra (mL)
1.0 = paso de luz en cm

CONTROL DE CALIDAD

Se debe correr rutinariamente sueros control normal y anormal con concentraciones conocidas para monitorear la validez de la reacción. Estos controles se deben correr por lo menos cada vez que se vayan a procesar determinaciones de LDH. Se recomienda que cada laboratorio tenga su propia frecuencia de determinación de control.

VALORES ESPERADOS

Hombres: 50 - 166 UI/L (30°C) 80 – 285 (37°C)
Mujeres: 60 - 132 UI/L (30°C) 103 – 227 (37°C)
Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

LINEARIDAD

0-1000 UI/L

FABRICADO POR:

POINTE SCIENTIFIC, INC.
E.E.U.U.