

ENZIMAS

LACTATODESHIDROGENASA

Objetivos

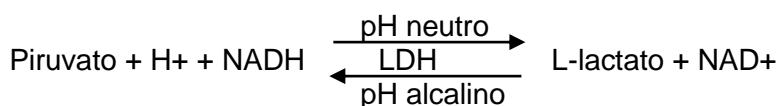
- Determinación de LDH por método cinético.
- Interpretación de la información provista por el fabricante de métodos.

INTRODUCCIÓN

Lactatodeshidrogenasa, L-lactato NAD óxidoreductasa, LDH, LD, (EC 1.1.1.27)

PM 140000 D, Clase química: proteína

La lactato deshidrogenasa (LD) es una enzima presente en todas las células del organismo, que cataliza la siguiente reacción:



El pH alcalino favorece la conversión de lactato a piruvato y el pH neutro favorece la reacción inversa. Es una proteína tetramérica con dos tipos de subunidades denominadas H (heart=corazón) y M (muscle=músculo) que generan 4 isoenzimas: LD1=HHHH o H4, LD2=HHHM o H3M, LD3=HHMM o H2M2, LD4=HMMM o HM3 y LD5=MMMM o M4.

Debido a que la LDH es una enzima ubicua la elevación de su nivel sérico no es específica de un tejido u órgano. Conociendo la distribución tisular de las isoenzimas, es posible interpretar el perfil de isoenzimas de LDH hallado en un suero con una elevada actividad de LDH total. Los métodos utilizados para la separación y cuantificación de estas isoenzimas incluyen electroforesis, cromatografía e inmuno inhibición. Los más utilizados por su practicidad y costo son los electroforéticos.

ETAPA PREANALÍTICA

1) Condiciones del paciente:

FUENTES NO PATOLÓGICAS DE VARIACIÓN: BIOLÓGICAS Y PREANALÍTICAS

En los recién nacidos los niveles de LDH en suero son muy variables intra individuo según las hs de vida y también inter individuo. (Clinical Chemistry, vol 29, Dec 1996)

En los niños los valores son 10-15% mayores que en los adultos. En tercer trimestre del embarazo se observan niveles ligeramente elevados, posiblemente por acción de los estrógenos. Luego de realizar ejercicios se observan aumentos significativos. La ingestión de alcohol y de alimentos no altera el nivel sérico de LDH. El horario en que se toma la muestra no tiene efectos en los valores masculinos, pero en las mujeres se observó un aumento progresivo durante el día, con valores obtenidos a las 5 PM un 40% mayor que a las 9 AM. El éstasis venoso causa aumentos importantes y siempre debe evitarse.

2) Toma de muestra:

TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN

Las muestras más apropiadas para medir la actividad de la LDH son suero y plasma heparinizado, separados dentro de la hora de su obtención y sin hemólisis. Puede utilizarse EDTA. Debe centrifugarse 7 min a 3000 rpm para obtener plasma pobre en plaquetas. El oxalato inhibe la LDH.

Algunas isoenzimas son lábiles al frío, por ello el suero puede refrigerarse hasta 24 hs pero no congelarse.

Los eritrocitos contienen 150-300 veces más LDH que el plasma, por ello una mínima hemólisis eleva la actividad medida.

ETAPA ANALÍTICA

1) Metodología:

Se dispone de métodos fluorescentes y métodos espectrofotométricos visibles, U.V. y de reflectancia (química seca). Se prefiere la reacción piruvato a lactato dado que la constante de equilibrio de dicha

reacción es muy grande ($2,7 \times 10^{11}$) y la velocidad de la reacción para una misma cantidad de enzima es tres veces más rápida.

Asimismo la reacción de piruvato a lactato solo requiere 1/10 de la cantidad de NADH, que es muy costoso, mientras que en el método de lactato a piruvato se utiliza NAD, por lo cual se pueden usar muestras más pequeñas y períodos de medición más cortos. Las ventajas de la reacción lactato a piruvato son una mayor linealidad y menor inhibición por producto.

Método recomendado por la IFCC, la SSCC y la DGKC

FUNDAMENTO

El suero cuyo nivel de LDH se desea dosar, se mezcla con una solución que contiene piruvato, buffer de pH neutro y NADH. La velocidad de la reacción que genera NAD y lactato es proporcional al contenido de LDH, y se monitorea midiendo la velocidad de disminución de la absorbancia a 340 nm, que depende del contenido de NADH en la mezcla de reacción.

REACTIVOS

Rvo. 1: Solución buffer de fosfatos (50 mM, pH=7,5) y piruvato (0,6 mM)

Rvo. 2: viales con NADH liofilizado, reconstituibles con Rvo.1 y dan una solución con NADH 0,18 mM.

CONDICIONES DE REACCION

- Temperatura: 30 o 37 °C. A mayor temperatura se obtiene mayor sensibilidad pero menor rango de linealidad.
- Volumen de muestra y reactivo: Vol. M = 100 ul y Vol. Rvo. = 1 ml. Si el volumen de lectura del espectrofotómetro lo permite, se pueden reducir proporcionalmente sin que varíe el factor de cálculo.
- Longitud de onda: 340 nm
- pH: Se trabaja a pH 7,5.
- Estabilidad y almacenamiento del sustrato reconstituido: En el refrigerador (2-4 °C) es estable entre 1 y 7 días, según la marca comercial, desde su reconstitución. Cuando el espectrofotómetro ha sido llevado a cero con agua destilada y se observan lecturas de absorbancia del sustrato reconstituido inferiores a 0,700 D.O. o superiores a 1,800 D.O.(a 340nm), no utilizarlo.

PROCEDIMIENTO

Reconstituir el Reactivo liofilizado. Preincubar a 37 °C 1 ml por 5 min. Agregar 100 ul de muestra, mezclar por agitación y verter en la cubeta. Disparar el cronómetro. Esperar 10" y leer la absorbancia cada 15 segundos. Determinar las diferencias de absorbancia (ΔA), desechar los bajos o altos, calcular el ΔA promedio y utilizarlo para los cálculos

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

Factor = (vol. reacción / vol. muestra) $\times 1 / \text{coef. ext. NADH}$

Coeficiente de extinción del NADH a 340 nm = $6,22 \times 10^3 \text{ l/cm-mol}$

RENDIMIENTO ANALITICO DEL METODO

REPRODUCIBILIDAD: A un nivel de 320 U/l a 30 °C procesando replicados se obtiene un C.V. de 3 a 5%.

LINEALIDAD: La reacción es lineal hasta una actividad de 1000 U/l, con leves diferencias según el instrumental utilizado. Con actividades superiores, repetir diluyendo el suero 1/2 a 1/10 con solución fisiológica. Hacer siempre la menor dilución posible.

SENSIBILIDAD: a 340 nm y a 25 °C el mínimo cambio de actividad detectable es de 5 U/l.

VALORES DE REFERENCIA (U/l)

Temperatura	25°C	30°C	37°C
Adultos	100-240	120-300	150-360
Neonatos		277-550	
(perc. 5 y 95 a las 144 hs. de vida)			
Niños (< 3 años)		hasta 450	

ETAPA POSTANALITICA

1) Interpretación y validación del resultado

Los niveles de LDH se observan elevados en todo proceso con necrosis celular.

Los valores más altos (hasta 40 veces el valor de referencia) se ven en casos de anemia megaloblástica, en carcinomatosis extensas, shock grave con anoxia, y en hiperleucocitosis neoplásica. Aumentos moderados (2-5 veces) se observan en enfermos con infarto de miocardio, infarto pulmonar, leucemia granulocítica, anemia hemolítica y hepatomas.

Comparar esta guía con la guía del inserto provisto por Wiener del método a usar en el trabajo práctico y anotar las coincidencias o diferencias.

Buscar Valores de Referencia y citar la bibliografía.

BIBLIOGRAFIA

Kaplan-Pesce "Química Clínica". Edición 1984. Editorial Panamericana.

Henry, John Bernard "Diagnóstico y Tratamiento Clínico" 9^a edición. Editorial Salvat.

Balcells, Alfonso "La Clínica y el Laboratorio" 16^a edición. Editorial Masson S.A. Barcelona (España).

Gradwohl- Sonnerwirth- Jaret "Métodos y Diagnósticos del Laboratorio Clínico" 8^a edición 1983.

Capítulos 9 y 12. Editorial Panamericana.

Pesce - Kaplan "Química Clínica. Métodos". Edición 1990. Capítulos 12 y 17. Editorial Panamericana.

Todd - Sanford "Diagnóstico clínico por el laboratorio" I. Davidson y J. B. Henry. Editorial Salvat.

Agregar bibliografía utilizada para estudiar el tema.