

SAS-MX LD Isoenzyme

Instructions For Use REF 101900

SAS-MX Isoenzyme LDH
Fiche technique

SAS-MX LD-Isoenzym
Anleitung

SAS-MX Isoenzimi LDH
Istruzioni per l'uso

SAS-MX LD Isoenzyme
Instrucciones de uso

Contents

English	1
Français	7
Deutsch	13
Italiano	19
Español	25



INTENDED PURPOSE

The SAS-MX LD Isoenzyme Kit is intended for the separation and quantitation of Lactate Dehydrogenase Isoenzymes in serum or plasma by agarose gel electrophoresis.

Lactate dehydrogenase (LD) (EC 1.1.1.27) is an enzyme found in virtually all human tissues, with the liver, skeletal muscle, heart and kidney having the greatest concentrations. The wide distribution of LD in body tissues limits the usefulness of total LD determinations in diagnosis. Testing for the source of elevated LD activity may be indicated with isoenzyme assessment¹.

Five isoenzymes of LD can be demonstrated in human serum. Each isoenzyme is designated by a number which is related to its electrophoretic mobility. The fastest moving fraction (most anodic) is designated LD1 and is found primarily in heart muscle. The slowest moving (most cathodic) is LD5 found primarily in liver and skeletal muscle. The others - LD2, LD3, and LD4 are found in varying degrees along with LD1 and LD5 in all tissues^{1,2}.

The most important use of LD isoenzymes is in the diagnosis of myocardial damage. LD2 is found in highest concentration in normal human serum. The ratio LD1/LD2 is therefore less than one. Following myocardial infarction (MI), there is substantial elevation in LD1 so that the LD1/LD2 ratio following MI will approach or even exceed 1, a phenomenon referred to as 'flipped LD'. The LD level begins to rise approximately 12-24 hours following myocardial infarction, frequently reaching levels two to three times (or greater) the upper limit of normal. Peak activity is usually reached on day 3-4 and activity may remain elevated for as long as two weeks after infarction³.

The most definitive testing in the diagnosis of MI is accomplished by performing creatine kinase (CK) isoenzyme studies in conjunction with LD isoenzyme studies^{1,5}. The specificity and sensitivity achieved with these two tests has eliminated the necessity for additional enzyme studies in accurately diagnosing MI. Studies have shown that CK and LD isoenzyme analyses, in conjunction with the proper clinical setting and electrocardiogram results, are virtually 100% accurate in properly diagnosing myocardial infarction^{2,6}.

The isoenzymes of LD have been determined by various methods⁷⁻¹¹. Electrophoresis provides far more information than the other methods because it allows complete separation of all five isoenzymes with no risk of carryover. The support media used in electrophoresis includes cellulose acetate, agar, agarose and acrylamide gels¹.

The SAS-MX LD Isoenzyme Kit utilises a modification of the method of Preston⁸ and separates the lactate dehydrogenase isoenzymes according to mobility in an agarose gel. The isoenzyme bands are then visualised with a colorimetric reagent which quantitatively visualises the isoenzymes according to the following reaction sequence:

The patterns may be quantitated by densitometry at 595nm.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

All reagents are for in-vitro diagnostic use only. Do not ingest or pipette by mouth any kit component. Wear gloves when handling all kit components. Refer to the product safety data sheet for risk and safety phrases and disposal information.

COMPOSITION

1. SAS-MX LD Isoenzyme Gel (x10)

Contains agarose in a barbital buffer with sodium azide as preservative. The gel is ready for use as packaged.

2. LD Buffer Concentrate (2x 100ml)

Contains concentrated AMPD, barbital, bicine and aspartate buffer with sodium azide added as preservative. Dilute the contents of the bottle to 500ml with purified water and mix well.

3. LD Isoenzyme Reagent (10x 1ml)

Contains those components required for the identification of lactate dehydrogenase isoenzymes according to the reaction sequence shown above. See STEP-BY-STEP PROCEDURE for reconstitution instructions.

4. LD Isoenzyme Diluent (1x 15ml)

Contains AMPD, bicine, barbital and aspartate buffer, pH 8.1 - 8.3 with sodium azide as preservative.

5. Other Kit Components

Each kit contains Instructions For Use and sufficient Sample Application Templates and Blotters A, B, C and D to complete 10 gels.

STORAGE AND SHELF LIFE

1. SAS-MX LD Isoenzyme Gel

Gels should be stored at 15...30°C and are stable until the expiry date indicated on the package. DO NOT REFRIGERATE OR FREEZE. Deterioration of the gel may be indicated by 1) crystalline appearance indicating the gel has been frozen, 2) cracking and peeling indicating drying of the gel or 3) visible contamination of the agarose from bacterial or fungal sources.

2. LD Buffer

The buffer concentrate should be stored at 15...30°C and is stable until the expiry date indicated on the label. Diluted buffer is stable for 2 months at 15...30°C. Cloudiness or poor performance of the diluted buffer may indicate deterioration.

3. LD Isoenzyme Reagent

The reagent vials should be stored at 2...6°C and are stable until the expiry date indicated on the label. Reconstituted reagent is stable for 48 hours at 2...6°C kept in the dark.

4. LD Isoenzyme Diluent

The diluent should be stored at 2...6°C and is stable until the expiry date indicated on the label. Avoid contamination of the diluent. Cloudiness or poor performance may indicate deterioration.

ITEMS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Cat. No. 4063 Chamber

Cat. No. 1525 EPS600 Power Supply

Cat. No. 5014 Development weight

Cat. No. 4062 Incubation chamber

Drying oven with forced air capable of 60...70°C

Incubator capable of 45°C

Glass plate

Destain Solution: mix 100ml of glacial acetic acid with 900ml of purified water. Store in a tightly stoppered bottle.

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Fresh serum is the specimen of choice. Heparin or EDTA anticoagulated plasma can also be used, Oxalate inhibits LD activity and should not be used¹². Plasma should be platelet-free as platelets contain LD13. Samples should be tested as soon as possible after collection as no one storage condition is optimal for all isoenzymes^{12, 14, 15, 16}. If required, samples can be stored refrigerated at 15...30°C or 2...6°C for up to 48 hours¹². DO NOT FREEZE - freezing destroys LD5 activity¹².

Sample Collection: Proper timing of sample collection is critical for the accurate interpretation of LD Isoenzyme patterns in the assessment of MI. A minimum of 3 samples should be collected - one on admission, one 6-13 hours later and the third 24-37 hours following admission²⁻⁴.

Interfering factors:

- 1) Haemolysis may affect LD1 and LD2 quantitations as erythrocytes contain high levels of LD activity^{1,2,12}.
- 2) LD activity is reduced in uraemic sera due to the presence of inhibitors such as urea and oxalate. LD5 is particularly affected¹⁷.
- 3) Acetone and chloroform inhibit all isoenzymes except LD1¹⁴.
- 4) Certain drugs can affect LD isoenzyme activity¹⁸.

STEP-BY-STEP PROCEDURE

1. Remove the gel from the packaging and place on a paper towel. Blot the gel surface with a blotter C, discard the blotter.
2. Align the sample application template with the arrows at the edge of the gel. Place a blotter A on top of the template and rub a finger across the slits to ensure good contact. Remove the blotter and retain for use in step 5.
3. Apply 3µl of sample to each slit and allow to absorb for 3 minutes.
4. Whilst the sample is absorbing, pour 35ml of buffer into each inner section of the SAS-MX Chamber.
5. Following sample absorption, blot the template with the blotter A retained from Step 2 and remove both blotter and template.
6. Position the gel in the chamber agarose side down, aligning the positive (+) and the negative (-) sides with the corresponding positions on the chamber.
7. Electrophorese the gel: 100 volts, 15 minutes.
8. Whilst the samples are electrophoresing, place a blotter D moistened with water into the incubation chamber and place in the incubator set at 45°C to equilibrate.
9. Approximately 3-4 minutes before the end of electrophoresis, reconstitute one vial of LD Isoenzyme Reagent by adding 1 ml of LD Isoenzyme Diluent and mix well.
10. Following electrophoresis, place the gel agarose side up on the glass plate. Pour the contents of the LD Isoenzyme Reagent vial along the anode (+) edge of the gel.
11. Using a serological pipette, spread the reagent from the anode edge to the cathode (-) edge of the gel. Wait 15 seconds and spread the reagent back to the anode edge. Wait 15 seconds and roll the excess off the gel.
12. Place the gel in the incubation chamber. Incubate the gel: 25 minutes, 45°C.
13. Wash the gel in destain solution for 2 minutes.
14. Place the gel agarose side up on the glass plate. Place a blotter B (wetted in destain solution), 3 folded paper towels on to the surface of the gel. Press the gel for 3-5 minutes.
15. Remove the towels and blotter B and place the gel in destain solution for 1 minute.
16. Dry the gel at 60...70°C.

INTERPRETATION OF RESULTS

It is recommended that any evaluation of the gels is performed against normal values which have been produced for this test in each individual laboratory. Completed gels should be stored in the dark at all times.

Qualitative Evaluation: The SAS-MX LD Isoenzyme gel can be visually inspected for the presence or absence of bands of interest.

Quantitative Evaluation: Scan the gels at 595nm, slit 5 within 2 hours of completion. Completed gels should be stored in the dark at all times.

Following electrophoresis, 5 zones of LD activity are normally detected. the fastest zone (LD1) moves with a migration similar to the alpha globulins and the slowest zone (LD5) moves with the gamma globulins. The other 3 zones have intermediate mobilities. The LD activity in serum reflects the breakdown of numerous cell types and all 5 zones can be seen. LD2 predominates, followed by LD1 and LD3. LD4 and LD5 occur in minor amounts.

1. LD2 is the LD Isoenzyme present in the largest amounts in normal serum^{1-4,12}.
2. LD1 is elevated and may be greater than LD2 in:
 - a) Myocardial infarction^{1-4,12}.
 - b) Duchenne's muscular dystrophy presents a pattern like MI but clinical symptoms help in easily differentiating the two diseases^{19,20}.
 - c) Haemolysis (including haemolytic anaemias) should be strongly considered whenever total serum LD reaches levels greater than 5x normal and the isoenzymes show a greater LD1 and LD2. Total LD is much higher in haemolytic anaemia than in MI unless the MI is accompanied by severe shock. Pernicious anaemia in relapse gives an LD pattern like haemolysis and some of the highest total serum LD levels are found with this condition^{2,14}.
 - d) Renal infarct^{2,12}.
3. LD3 is elevated in pulmonary infarctions^{7,12,21}.
4. LD4 elevation has not been associated with any particular pathology.
5. LD5 is elevated in hepatic and muscular damage and skin diseases.
6. When total LD is markedly elevated but all of the isoenzymes have normal percentages, this is called an isomorphic pattern. Widely divergent groups of clinical diagnoses have shown this type of pattern and include cardiorespiratory diseases, malignancy, fracture, diseases of the central nervous system, infection and inflammation, hepatic cirrhosis, alcoholism, trauma without fracture, infectious mononucleosis, hypothyroidism, uraemia, necrosis, pseudomononucleosis, viraemia and intestinal obstruction^{1,2,22}.
7. LD and CK isoenzymes are less specific following open heart surgery than they are in most diagnostic situations. The CK-MB will be elevated due to myocardial damage from the operative procedure and trauma caused by manipulation and cannulation of the heart. The LD2/LD1 may be elevated secondary to haemolysis from extracorporeal circulation²²⁻²⁴.

QUALITY CONTROL

The CK/LD Control (Cat.No.5134) can be used to verify all phases of the procedure and should be used on each plate run. Refer to the package insert provided for acceptable assay values.

LIMITATIONS

The SAS-MX LD Isoenzyme method is not designed to identify tumour markers.

Refer to SAMPLE COLLECTION AND HANDLING for other interfering factors.

Further testing required:

1. Total LD activity may be determined. Conflicting reports exist about the true value of total serum enzyme levels and the severity of a disease^{1,4,25}.
2. In diagnosing MI, CK Isoenzyme studies should also be performed^{1,4}.
3. Haptoglobin studies may be performed to rule out haemolysis as a cause of elevated LD1 and LD2.

BIBLIOGRAPHY

1. Brish, L.K. 'CK & LD Isoenzymes A Self-Instructional Text', Am. Soc. of Clin. Path. Press, Chicago, 1984: 85-120.
2. Hadden, D.M. and Prentiss, T., 'Cardiac Profiling by Electrophoresis', Lab. Mgt., 1977; May: 19-24.
3. Henry, J.D. 'Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods', 16th Edition, 1979; 1: 366-369, W.B. Saunders Co., Philadelphia.
4. Galen, R.S., Reiffel, J.A. and Gambino, S.R., 'Diagnosis of Acute Myocardial Infarction', J. Am. Med. Assoc., 1975; 232(2): 145-147.
5. Frolich, J., Brosseuk, A., Grant, A. and McLennan, M., 'Study of the Value of CPK and LDH Isoenzyme Determinations in the Differential Diagnosis of Ischemic Chest Pain', Clin. Biochem., 1978; 11(6): 232-234.
6. Wagner, G.S., Roe, C.R., Limbird, L.E., Rosati, R.A. and Wallace, A.G., 'The Importance of Identification of the Myocardial-Specific Isoenzyme of Creatine Phosphokinase (MB Form) in the Diagnosis of Acute Myocardial Infarction', Circulation, 1973; 47: 263-269.
7. Nerenberg, S.T., 'Electrophoretic Screening Procedures', 1973: 96-125, Lea & Febiger, Philadelphia.
8. Preston, J.A., Briere, R.O. and Batsakis, J.G., 'Rapid Electrophoretic Separation of Lactate Dehydrogenase Isoenzymes on Cellulose Acetate', Am. J. Clin. Pathol., 1965; 43(3): 256-260.
9. Hsu, M-Y., Kohler, M.M., Barolia, L. and Bondar, R.J.L., 'Separation of Five Isoenzymes of Serum Lactate Dehydrogenase by Discontinuous Gradient Elution from a Miniature Ion-Exchange Column', Clin. Chem., 1979; 25(8): 1453-1458.
10. Usategui-Gomez, M., Wicks, R.W. and Warshaw, M., 'Immunochemical Determination of the Heart Isoenzyme of Lactate Dehydrogenase(LDH1) in Human Serum', Clin. Chem., 1979; 25(5): 729-734.
11. Rotenberg, Z., Weinberger, I., Sagie, A., Fuchs, J., Sperling, O. and Agmon, J., 'Lactate Dehydrogenase Isoenzymes in Serum During Recent Acute Myocardial Infarction', Clin. Chem., 1987; 33(8): 1419-1420.
12. Tietz, N.W. et al., 'Textbook of Clinical Chemistry', 1986: 691-700, W.B. Saunders Co., Philadelphia.
13. Rothwell, D.J., Jendrzyczak, B., Becker, M. and Dumas, B.T., 'Lactate Dehydrogenase Activities in Serum and Plasma', Clin. Chem., 1976; 22(7): 1024-1026.
14. Latner, A.L. and Skillen, A.W., 'Isoenzymes in Biology and Medicine', 1968: 146-157, Academic Press, London.
15. Kreuzer, H.H. and Fennis, W.H.S., 'Lactic Dehydrogenase Isoenzymes in Blood Serum after Storage at Different Temperatures', Clin. Chim. Acta, 1964; 9: 64-68.

16. Galen, R.S., Personal Communication, Dec. 1981.
17. Clark, P.I., Kostuk, W.J. and Henderson, A.R., 'Time-Dependency of Human Lactate Dehydrogenase Isoenzyme 5 Inhibition by Urea', *Clin. Chem.*, 1976; 22(12): 2059.
18. Young, D.S., 'Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests', 3rd Ed., 1990, AACC Press, Washington D.C.
19. Roses, A.D., Roses, M.J., Nicholson, G.A. and Roe, C.R., 'Lactate Dehydrogenase Isoenzyme 5 in Detecting carriers of Duchenne Muscular Dystrophy', *Neurology*, 1977; 27(May): 414-421.
20. Yasmineh, W.G., Ibrahim, G.A., Abbasnezhad, M. and Awad, E.A., 'Isoenzyme Distribution of Creatine Kinase and lactate Dehydrogenase in Serum and Skeletal Muscle in Duchenne Muscular Dystrophy, Collagen Disease, and Other Muscular Disorders', *Clin. Chem.*, 1978; 24(11): 1985-1989.
21. Papadopoulos, N.M., 'Clinical Applications of Lactate Dehydrogenase Isoenzymes', *Annals of Clin. Lab. Sci.*, 1977; 7(6): 506-510.
22. Jacobs, D.S., Robinson, R.A., Clark, G.M. and Tucker, J.M., 'Clinical Significance of the Isomorphic Pattern of the Isoenzymes of Serum Lactate Dehydrogenase', *Annals of Clin. and Lab. Sci.*, 1977; 7(5): 411-421.
23. Galen, R.S., 'Diagnostic Tests in Cardiac and Non-Cardiac Disorders' *Diag. Med.*, 1978 Feb., 74-87.
24. Mohiuddin, S.M., Raffetto, J., Sketch, M.H., Lynch, J.D., Schultz, R.D. and Runco, V., 'LDH Isoenzymes and Myocardial Infarction in patients Undergoing Coronary Bypass Surgery: An Excellent Correlation', *Am. Heart J.*, 1976; 92(5): 584-588.
25. Chapelle, J-P., Albert, A., Smeets, J-P., Marechal, J-P., Heusghem, C. and Kulbertus, H.E., 'Does Lactate Dehydrogenase Isoenzyme-5 Contribute to the Predictive Power of Total Lactate Dehydrogenase in Myocardial Infarction?' *Clin. Chem.*, 1983; 29(5): 774-777.

UTILISATION

Le kit SAS-MX Isoenzyme LDH est destiné à la séparation et la quantification des isoenzymes de la lactate déshydrogénase du sérum ou du plasma par électrophorèse en gel d'agarose.

La lactate déshydrogénase (LDH) (EC 1.1.1.27) est une enzyme se trouvant dans pratiquement tous les tissus humains, avec une concentration plus importante dans le foie, dans les muscles squelettiques, dans le cœur et dans les reins. Étant donné que la LDH est largement présente dans les tissus corporels, l'utilité du dosage de la LDH totale dans les diagnostics est limitée. Une analyse de l'isoenzyme peut indiquer la source d'une activité LDH élevée.

Il est possible de trouver dans le sérum humain cinq isoenzymes de la LDH. Chaque isoenzyme est désignée par un chiffre en rapport avec sa mobilité électrophorétique. La fraction se déplaçant le plus rapidement (principalement anodique) est appelée LDH-1 et se trouve principalement dans le muscle cardiaque. Celle se déplaçant le plus lentement (principalement cathodique) est la LDH-5 et se trouve principalement dans le foie et les muscles squelettiques. Les autres (LDH-2, LDH-3 ET LDH-3), ainsi que la LDH-1 et la LDH-5, sont présentes à divers degrés dans tous les tissus^{1,2}.

Les isoenzymes LDH sont principalement utilisées pour le diagnostic des lésions myocardiques. La LDH-2 est la plus présente dans le sérum humain normal. Le rapport LDH-1/LDH-2 est donc inférieur à un. Suite à un infarctus du myocarde (IDM), il y a une élévation substantielle du taux de LDH-1 si bien que le rapport LDH-1/LDH-2 post-IDM se rapproche ou même dépasse 1, phénomène appelé « rapport LDH inversé ». Le taux de LDH commence à augmenter environ 12-24 heures après un infarctus du myocarde et atteint souvent des valeurs deux à trois fois (ou plus) supérieures à la limite supérieure normale. L'activité maximale est en général atteinte 3-4 jours après et elle reste élevée deux semaines après l'infarctus².

L'étude conjointe des isoenzymes de la créatine kinase (CK) et de celles de la LDH constitue l'analyse de référence pour le diagnostic d'IDM³. La spécificité et la sensibilité offertes par ces deux dosages ont rendu inutile toute analyse d'autres enzymes pour obtenir un diagnostic d'IDM exact. Des études ont montré que l'analyse des isoenzymes de la CK et de la LDH, unie aux résultats de l'électrocardiogramme et à un tableau clinique approprié, permet de réaliser un diagnostic correct d'un infarctus du myocarde avec une fiabilité de l'ordre 100%⁴.

Plusieurs méthodes permettent de doser les isoenzymes de la LDH⁷⁻¹¹. L'électrophorèse fournit plus d'informations que les autres méthodes car elle permet d'obtenir une séparation complète des cinq isoenzymes sans aucun risque de contamination. Les gels d'acétate de cellulose, de gélose, d'agarose et d'acrylamide sont les supports utilisés pour l'électrophorèse¹. Le kit SAS-MX Isoenzyme LDH utilise une variation de la méthode de Preston⁸ et sépare les isoenzymes de la lactate déshydrogénase suivant leur mobilité sur un gel d'agarose. Les bandes d'isoenzymes sont ensuite mises en évidence de façon quantitative par un réactif de coloration conformément à la série de réactions suivante:

Un densitomètre à 595nm permet de quantifier les bandes.

PRÉCAUTIONS

Tous les réactifs sont à usage diagnostic in-vitro uniquement. Ne pas ingérer ou pipeter à la bouche aucun composant. Porter des gants pour la manipulation de tous les composants. Se reporter aux fiches de sécurité des composants du kit pour la manipulation et l'élimination.

COMPOSITION

1. Plaque SAS-MX Isoenzyme LDH (x10)

Contient de l'agarose dans un tampon barbital additionné d'azide de sodium comme conservateur. Le gel est prêt à l'emploi.

2. Tampon concentré LDH (2x 100ml)

Contient un tampon concentré AMPD, barbital, bicine et aspartate additionné d'azide de sodium comme conservateur. Diluer le contenu du flacon dans 500ml d'eau distillée et bien mélanger.

3. Réactif Isoenzyme LDH (10x 1ml)

Contient les composants nécessaires pour identifier les isoenzymes de la lactate déshydrogénase conformément à la série de réactions indiquée auparavant. La section MÉTHODOLOGIE fournit les instructions nécessaires à la reconstitution.

4. Diluant Isoenzyme LDH (1x 15ml)

Contient un tampon AMPD, bicine, barbital et aspartate, pH 8,1 – 8,3, additionné d'azide de sodium comme conservateur.

5. Autres composants du kit

Chaque kit contient également une fiche technique, des buvards A, B, C et D et des masques applicateur échantillons (Template) pour 10 gels.

STOCKAGE ET CONSERVATION

1. Plaque SAS-MX Isoenzyme LDH

Les gels doivent être conservés entre 15...30°C; ils sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage. NE PAS RÉFRIGÉRER OU CONGELER. Les conditions suivantes indiquent une détérioration du gel: 1) des cristaux visibles indiquant que le gel a été congelé, 2) des craquelures indiquant une déshydratation du gel, 3) une contamination visible, bactérienne ou fongique.

2. Tampon LDH

Le tampon concentré doit être conservé entre 15...30°C; il est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Après reconstitution, le tampon est stable 2 mois entre 15...30°C. Un aspect floconneux ou une perte de performance indique une détérioration du tampon reconstitué.

3. Réactif Isoenzyme LDH

Les flacons de réactif doivent être conservés entre 2...6°C; ils sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Le réactif reconstitué est stable 48 heures entre 2...6°C à l'abri de la lumière.

4. Diluant Isoenzyme LDH

Le diluant doit être conservé entre 2...6°C; il est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Éviter toute contamination. Un aspect floconneux ou une perte de performance indique une détérioration du produit.

MATÉRIELS NÉCESSAIRES NON FOURNIS

Réf. 4063 Chambre de migration

Réf. 1525 Générateur EPS600

Réf. 5014 Poids à développement

Réf. 4062 Chambre d'incubation

Étuve de séchage à convection forcée offrant une température entre 60...70°C

Incubateur offrant une température de 45°C

Plaque de verre

Solution décolorante: Mélanger 100ml d'acide acétique glacial avec 900ml d'eau distillée. Conserver en bouteille hermétiquement fermée.

PRÉLÈVEMENTS DES ÉCHANTILLONS

L'utilisation de sérums fraîchement prélevés est fortement recommandée. Il est aussi possible d'utiliser du plasma prélevé sur héparine ou EDTA. L'oxalate ne doit pas être utilisé car il inhibe l'activité de la LDH¹². Le plasma doit être sans plaquettes car elles contiennent de la LDH¹³. Les échantillons doivent être analysés le plus rapidement possible après le prélèvement puisque aucune méthode de conservation n'est optimale pour toutes les isoenzymes^{12, 14, 15, 16}. En cas de besoin, il est possible de conserver les échantillons entre 15...30°C ou entre 2...6°C 48 heures maximum¹². **NE PAS CONGELER:** l'activité de la LDH-5 en serait détruite¹².

Prélèvement de l'échantillon: il est essentiel que le prélèvement des échantillons soit correctement planifié pour bien interpréter les types d'isoenzymes de la LDH lors du diagnostic d'IDM. Trois échantillons au moins sont nécessaires: le premier à l'admission du patient, le deuxième 6-13 heures après et le troisième 24-37 heures après^{2,4}.

Facteurs interférents:

- 1) En cas d'hémolyse, le dosage de la LDH-1 et de la LDH-2 risque d'être altéré puisque les érythrocytes contiennent un taux élevé d'activité LDH^{1,2,12}.
- 2) L'activité LDH est réduite dans les sérums urémiques en raison de la présence d'inhibiteurs comme l'urée et l'oxalate. La LDH-5 est tout particulièrement affectée¹⁷.
- 3) L'acétone et le chloroforme inhibent toutes les isoenzymes sauf la LDH-1¹⁴.
- 4) Certains médicaments peuvent altérer l'activité des isoenzymes de la LDH¹⁸.

MÉTHODOLOGIE

1. Sortir le gel de son emballage et le déposer sur un papier absorbant. Sécher la surface du gel à l'aide d'un buvard C, jeter le buvard.
2. Disposer le masque applicateur échantillon en faisant correspondre les flèches avec les 2 fentes latérales. Placer un buvard A sur le masque et passer délicatement le doigt sur les fentes afin d'assurer un contact optimal. Retirer le buvard A et le conserver pour l'étape 5.
3. Déposer 3µl d'échantillon sur chaque fente et laisser absorber 3 minutes.
4. Pendant ce temps, verser 35ml de tampon dans chaque compartiment intérieur de la chambre de migration SAS-MX.
5. Une fois l'absorption de l'échantillon terminée, sécher le masque applicateur avec le buvard A conservé à l'étape 2 puis enlever le buvard et le masque applicateur.
6. Placer le gel, agarose vers le bas, dans la chambre de migration, en respectant les polarités.
7. Faire migrer à 100 volts pendant 15 minutes.
8. Pendant que la migration a lieu, placer un buvard D humidifié avec de l'eau dans la chambre d'incubation et la régler à 45°C pour qu'elle s'équilibre.

9. Environ 3-4 minutes avant la fin de l'électrophorèse, reconstituer 1 flacon de réactif Isoenzyme LDH en ajoutant 1 ml de diluant Isoenzyme LDH et bien mélanger.
10. Une fois l'électrophorèse terminée, placer le gel, agarose vers le haut, sur la plaque de verre. Verser le contenu du flacon de réactif Isoenzyme LDH du côté anodique (+) du gel.
11. À l'aide d'une pipette sérologique, étaler le réactif depuis le côté anodique jusqu'au côté cathodique (-) du gel. Attendre 15 secondes puis étaler à nouveau le réactif vers l'anode. Attendre 15 secondes puis enlever l'excès.
12. Placer le gel dans la chambre d'incubation. Incuber le gel pendant 25 minutes à 45°C.
13. Laver le gel dans la solution décolorante pendant 2 minutes.
14. Placer le gel, agarose vers le haut, sur la plaque de verre. Déposer sur la surface du gel un buvard B (imbibé de solution décolorante) puis 3 papiers absorbants. Presser le gel pendant 3 à 5 minutes.
15. Enlever les papiers absorbants et le buvard B puis mettre le gel dans la solution décolorante pendant 1 minute.
16. Sécher le gel entre 60...70°C.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Il est recommandé de réaliser chaque évaluation en comparant les gels à un modèle normal obtenu dans les mêmes conditions pour chaque laboratoire. Les gels terminés doivent toujours être conservés à l'abri de la lumière.

Évaluation qualitative: Une inspection visuelle du gel SAS-MX Isoenzyme LDH permet de déterminer si les bandes des isoenzymes sont présentes ou non.

Évaluation quantitative: Lire les gels à 595nm, fente 5, dans les 2 heures suivant la fin du processus. Les gels terminés doivent toujours être conservés à l'abri de la lumière.

La migration permet normalement de détecter 5 zones d'activité LDH. La zone la plus rapide (LDH-1) a une migration similaire à celle des alpha-1-globulines et la plus lente (LDH-5) migre avec les gammaglobulines. Les 3 autres zones ont des mobilités intermédiaires. L'activité LDH dans le sérum reflète la répartition de différents types de cellules et il est possible de voir les 5 zones. La LDH-2 est la plus présente, suivie de la LDH-1 et de la LDH-3. La LDH-4 et la LDH-5 sont présentes en moindre quantité.

1. La LDH-2 est l'isoenzyme de la LDH la plus présente dans le sérum normal^{1-4,12}.
2. Le taux de LDH-1 est élevé et même supérieur à celui de la LDH-2 dans les cas suivants:
 - a) Infarctus du myocarde^{1,4,12}.
 - b) Dystrophie musculaire de Duchenne: le résultat de l'électrophorèse est similaire à celui obtenu chez un patient présentant un IDM, mais les symptômes cliniques permettent de différencier facilement les deux maladies^{19,20}.
 - c) Hémolyse (y compris les anémies hémolytiques): doit être envisagée si le taux de LDH total sérique est 5 fois supérieur à la normale et que la LDH-1 et la LDH-2 sont plus élevées. Le taux de LDH total est plus élevé en cas d'anémie hémolytique qu'en cas d'IDM à moins qu'il n'y ait un IDM ne soit accompagné d'un état de choc grave. Une rechute d'anémie pernicieuse donne des résultats similaires à ceux obtenus en cas d'hémolyse et c'est dans ce cas que l'on trouve les taux de LDH totale les plus élevés^{2,14}.
 - d) Infarctus rénal^{2,12}.
3. La LDH-3 est élevée en cas d'infarctus pulmonaire^{7,12,21}.
4. L'augmentation du taux de la LDH-4 n'a été associée avec aucune pathologie spécifique.
5. La LDH-5 est élevée en cas de lésions hépatiques ou musculaires et de maladies de la peau¹.

6. Si le taux de LDH total est nettement élevé mais que le pourcentage relatif des isoenzymes est normal, on parle de résultats isomorphes. Ce genre de résultat correspond à des pathologies diverses : maladies cardiorespiratoires, malignité, fracture, maladies du système nerveux central, infection et inflammation, cirrhose hépatique, alcoolisme, trauma sans fracture, mononucléose infectieuse, hypothyroïdie, urémie, nécrose, pseudo-monucléose, virémie, occlusion intestinale, entre autres.^{1,22}
7. Les isoenzymes LDH et CK sont moins spécifiques suite à une opération à cœur ouvert qu'elles ne le sont pour la plupart des diagnostics. La CK-MB est élevée en raison des lésions du myocarde lors de l'opération et du trauma lié à la manipulation et à la canulation du cœur. Le rapport LDH-1/LDH-2 risque d'être élevé suite à l'hémolyse due à la circulation extracorporelle.^{22,24}

CONTRÔLE QUALITÉ

Le contrôle CK/LDH (Réf. 5134) peut être utilisé afin de vérifier toutes les phases de la méthode et doit être déposé sur chaque plaque. La notice jointe indique les valeurs acceptables du dosage.

LIMITES

La méthode SAS-MX Isoenzyme LDH n'est pas conçue pour identifier des marqueurs tumoraux.

La section PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS fournit des renseignements à propos des facteurs interférents.

Analyses supplémentaires nécessaires :

1. Il est possible de déterminer l'activité totale de la LDH. Il existe des rapports non concordants sur la valeur normale du taux d'enzymes totales dans le sérum et son rapport avec la gravité des maladies.^{1,4,25}
2. Pour le diagnostic d'un IDM, il est aussi nécessaire d'analyser les isoenzymes de la CK^{1,4}.
3. Il est possible d'analyser l'haptoglobine pour écarter la possibilité d'une hémolyse causant des taux de LDH-1 et de LDH-2 élevés.

BIBLIOGRAPHIE

1. Brish, L. K., 'CK & LD Isoenzymes A Self-Instructional Text', Am. Soc. of Clin. Path. Press, Chicago, 1984 : 85-120.
2. Hadden, D. M. et Prentiss, T., 'Cardiac Profiling by Electrophoresis', Lab. Mgt., 1977 ; mai : 19-24.
3. Henry, J. D., 'Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods', 16^e édition, 1979 ; 1 : 366-369, W. B. Saunders Co., Philadelphie.
4. Galen, R. S., Reiffel, J. A. et Gambino, S. R., 'Diagnosis of Acute Myocardial Infarction', J. Am. Med. Assoc., 1975 ; 232(2) : 145-147.
5. Frolich, J., Brosseuk, A., Grant, A. et McLennan, M., 'Study of the Value of CPK and LDH Isoenzyme Determinations in the Differential Diagnosis of Ischemic Chest Pain', Clin. Biochem., 1978 ; 11(6) : 232-234.
6. Wagner, G. S., Roe, C. R., Limbird, L. E., Rosati, R. A. et Wallace, A. G., 'The Importance of Identification of the Myocardial-Specific Isoenzyme of Creatine Phosphokinase (MB Form) in the Diagnosis of Acute Myocardial Infarction', Circulation, 1973 ; 47 : 263-269.
7. Nerenberg, S. T., 'Electrophoretic Screening Procedures', 1973 : 96-125, Lea & Febiger, Philadelphie.

8. Preston, J. A., Briere, R. O. et Batsakis, J. G., 'Rapid Electrophoretic Separation of Lactate Dehydrogenase Isoenzymes on Cellulose Acetate', *Am. J. Clin. Pathol.*, 1965 ; 43(3) : 256-260.
9. Hsu, M-Y., Kohler, M. M., Barolia, L. et Bondar, R. J. L., 'Separation of Five Isoenzymes of Serum Lactate Dehydrogenase by Discontinuous Gradient Elution from a Miniature Ion-Exchange Column', *Clin. Chem.*, 1979 ; 25(8) : 1453-1458.
10. Usategui-Gomez, M., Wicks, R. W. et Warshaw, M., 'Immunochemical Determination of the Heart Isoenzyme of Lactate Dehydrogenase(LDH1) in Human Serum', *Clin. Chem.*, 1979 ; 25(5) : 729-734.
11. Rotenberg, Z., Weinberger, I., Sagie, A., Fuchs, J., Sperling, O. et Agmon, J., 'Lactate Dehydrogenase Isoenzymes in Serum During Recent Acute Myocardial Infarction', *Clin. Chem.*, 1987 ; 33(8) : 1419-1420.
12. Tietz, N. W. et al., 'Textbook of Clinical Chemistry', 1986 : 691-700, W. B. Saunders Co., Philadelphie.
13. Rothwell, D. J., Jendrzejczak, B., Becker, M. et Doumas, B.T., 'Lactate Dehydrogenase Activities in Serum and Plasma', *Clin. Chem.*, 1976 ; 22(7) : 1024-1026.
14. Latner, A. L. et Skillen, A. W., 'Isoenzymes in Biology and Medicine', 1968 : 146-157, Academic Press, Londres.
15. Kreutzer, H. H. et Fennis, W. H. S., 'Lactic Dehydrogenase Isoenzymes in Blood Serum after Storage at Different Temperatures', *Clin. Chim. Acta*, 1964 ; 9 : 64-68.
16. Galen, R. S., Personal Communication, déc. 1981.
17. Clark, P. I., Kostuk, W. J. et Henderson, A. R., 'Time-Dependency of Human Lactate Dehydrogenase Isoenzyme 5 Inhibition by Urea', *Clin. Chem.*, 1976 ; 22(12) : 2059.
18. Young, D. S., 'Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests', 3^e éd., 1990, AACC Press, Washington D.C.
19. Roses, A. D., Roses, M. J., Nicholson, G. A. et Roe, C. R., 'Lactate Dehydrogenase Isoenzyme 5 in Detecting carriers of Duchenne Muscular Dystrophy', *Neurology*, 1977 ; 27(mai) : 414-421.
20. Yasmineh, W. G., Ibrahim, G. A., Abbasnezhad, M. et Awad, E. A., 'Isoenzyme Distribution of Creatine Kinase and lactate Dehydrogenase in Serum and Skeletal Muscle in Duchenne Muscular Dystrophy, Collagen Disease, and Other Muscular Disorders', *Clin. Chem.*, 1978 ; 24(11) : 1985-1989.
21. Papadopoulos, N. M., 'Clinical Applications of Lactate Dehydrogenase Isoenzymes', *Annals of Clin. Lab. Sci.*, 1977 ; 7(6) : 506-510.
22. Jacobs, D. S., Robinson, R. A., Clark, G. M. et Tucker, J. M., 'Clinical Significance of the Isomorphic Pattern of the Isoenzymes of Serum Lactate Dehydrogenase', *Annals of Clin. and Lab. Sci.*, 1977 ; 7(5) : 411-421.
23. Galen, R. S., 'Diagnostic Tests in Cardiac and Non-Cardiac Disorders', *Diag. Med.*, fév. 1978, 74-87.
24. Mohiuddin, S. M., Raffetto, J., Sketch, M. H., Lynch, J. D., Schultz, R. D. et Runco, V., 'LDH Isoenzymes and Myocardial Infarction in patients Undergoing Coronary Bypass Surgery: An Excellent Correlation', *Am. Heart J.*, 1976 ; 92(5) : 584-588.
25. Chapelle, J-P., Albert, A., Smeets, J-P., Marechal, J-P., Heusghem, C. et Kulbertus, H.E., 'Does Lactate Dehydrogenase Isoenzyme-5 Contribute to the Predictive Power of Total Lactate Dehydrogenase in Myocardial Infarction?' *Clin. Chem.*, 1983 ; 29(5) : 774-777.

ANWENDUNGSBEREICH

Das SAS-MX LD-Isoenzym Kit dient der Trennung und Quantifizierung von Isoenzymen der Lactat-Dehydrogenase im Serum oder Plasma durch Elektrophorese im Agarose-Gel.

Lactat-Dehydrogenase (LD) (EC 1.1.1.27) ist ein Enzym, das praktisch in allen menschlichen Geweben nachzuweisen ist, wobei Leber, Skelettmuskulatur, Herz und Nieren die höchsten Konzentrationen haben. Diese weite Verbreitung des LD im menschlichen Gewebe beschränkt den Nutzen einer Gesamt-LD-Bestimmung zu Diagnosezwecken. Bei der Untersuchung der Ursache dieser erhöhten LD-Aktivität kann eine Befundung der Isoenzyme indiziert sein¹.

Fünf LD-Isoenzyme können im Humanserum nachgewiesen werden. Jedes Isoenzym wird mit einer Nummer bezeichnet, die sich auf ihre elektrophoretische Mobilität bezieht. Die Fraktion, die sich am schnellsten bewegt (d. h. nahe der Anode) wird LD-1 genannt und wird in erster Linie im Herzmuskel gefunden. LD-5 ist die langsamste Fraktion (d. h. nahe der Kathode) und wird in erster Linie in der Leber und Skelettmuskulatur gefunden. Die anderen – LD-2, LD-3 und LD-4 sind in unterschiedlichem Maß mit LD-1 und LD-5 in allen Geweben zu finden^{1,2}.

Die Bestimmung der LD-Isoenzyme spielt in der Diagnose einer Myokardverletzung eine wichtige Rolle. LD-2 findet man im normalen Humanserum in hoher Konzentration. Der Quotient LD-1/LD-2 ist deswegen kleiner Eins. Nach einem Myokardinfarkt (MI) kommt es zu einer deutlichen Erhöhung von LD-1, so dass der Quotient LD-1/LD-2 nach einem MI gegen 1 oder sogar darüber sein kann. Dieses Phänomen wird als „umgekehrten LD-Quotienten“ („flipped LD“) bezeichnet. Die LD-Werte beginnen ca. 12-24 Stunden nach dem Myokardinfarkt zu steigen und erreichen dabei häufig Werte, die zwei- bis dreimal höher sind als die Grenze des oberen Normalbereichs oder noch darüber. Die Spitze der Aktivität wird in der Regel am 3-4 Tag erreicht und kann bis zu zwei Wochen nach dem Infarkt erhöht bleiben².

Die definitiv beste Diagnose des MI wird durch die Bestimmung der Kreatinkinase-(CK)-Isoenzyme in Verbindung mit den LD-Isoenzymen erzielt^{1,5}. Die mit diesen zwei Tests erreichte Spezifität und Sensivität hat zusätzliche Enzymtests zur genauen MI-Diagnose überflüssig gemacht. Studien haben gezeigt, dass CK- und LD-Isoenzymbestimmungen in Verbindung mit dem entsprechenden klinischen Bild und den Ergebnissen des Elektrokardiogramms eine praktisch 100% richtige Diagnose des Myokardinfarkts gewährleisten^{2,6}.

Die LD-Isoenzyme sind mit den verschiedensten Methoden bestimmt worden⁷⁻¹¹. Die Elektrophorese bietet eine bei weitem größere Informationsfülle als anderen Methoden, weil sie eine vollständige Trennung aller 5 Isoenzyme ohne Gefahr einer Verschleppung gestattet. Die Trägermedien zur Elektrophorese sind unter anderem Zelluloseacetat-, Agar-, Agarose- und Acrylamid-Gele.

Das SAS-MX LD-Isoenzym Kit benutzt eine nach Preston⁸ modifizierte Methode und trennt die Isoenzyme der Lactat-Dehydrogenase im Agarose-Gel entsprechend ihrer Mobilität auf. Die Isoenzym-Banden werden dann mit einem kolorimetrischen Reagenz sichtbar gemacht, das die Isoenzyme quantitativ gemäß des folgenden Reaktionsablaufs darstellt:

Das Bandenmuster kann quantitativ mittels Densitometrie bei 595 nm gemessen werden.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle Reagenzien sind nur zur in-vitro Diagnostik bestimmt. Nicht einnehmen oder mit dem Mund pipettieren. Beim Umgang mit den Kit-Komponenten ist das Tragen von Handschuhen erforderlich. Bitte lesen Sie das Sicherheitsdatenblatt mit den Gefahrenhinweisen und Sicherheitsvorschlägen sowie die Informationen zur Entsorgung.

INHALT

1. SAS-MX LD-Isoenzym-Gel (x10)

Enthält Agarose in einem Barbital-Puffer mit Natriumazid als Konservierungsmittel. Das Gel ist gebrauchsfertig verpackt.

2. LD-Puffer-Konzentrat (2x 100ml)

Enthält konzentrierten AMPD / Barbital / Bicine / Aspartat-Puffer mit Natriumazid als Konservierungsmittel. Den Inhalt der Flasche mit dest. Wasser auf 500ml verdünnen. Gut schütteln.

3. LD-Isoenzym-Reagenz (10x 1ml)

Enthält die wie im obigen Reaktionsablauf gezeigten und zur Identifikation von Lactat-Dehydrogenase-Isoenzymen benötigten Bestandteile. Siehe SCHRITT-FÜR-SCHRITT METHODE für die Rekonstitutionsanleitung.

4. LD-Isoenzym-Verdünnungslösung (1x 15ml)

Enthält AMPD, Bicine, Barbital und Aspartat-Puffer, pH 8,1–8,3 mit Natriumazid als Konservierungsmittel.

5. Weitere Kit-Komponenten

Jedes Kit enthält eine Methodenbeschreibung sowie die zur Durchführung der Elektrophorese notwendigen Auftragschablonen, Blotter A, B, C und D für 10 Gele.

LAGERUNG UND STABILITÄT

1. SAS-MX LD-Isoenzym-Gel

Gele sollten bei 15...30°C gelagert werden und sind bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. NICHT IM KÜHLSCHRANK ODER TIEFKÜHLSCHRANK AUFBEWAHREN! Der Zustand des Gels kann sich verschlechtern. Dafür gibt es folgende Merkmale: 1) Kristallisation weist auf vorangegangenes Einfrieren hin, 2) Risse und Ablösen weisen auf ein Austrocknen des Gels hin, und 3) sichtbare Kontamination der Agarose durch Bakterien oder Pilze.

2. LD-Puffer

Das Pufferkonzentrat sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Die verdünnte Pufferlösung ist bei einer Temperatur von 15...30°C für 2 Monate stabil. Trübung oder schlechte Ergebnisse des verdünnten Puffers kann auf einen Verfall hinweisen.

3. LD-Isoenzym-Reagenz

Die Reagenzfläschchen sollten bei 2...6°C gelagert werden und sind bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Rekonstituiertes Reagenz ist bei einer Temperatur von 2... 6°C für 48 Stunden stabil. Dunkel lagern.

4. LD-Isoenzym-Verdünnungslösung

Der Verdünnungspuffer sollte bei 2...6°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Kontamination der Verdünnungslösung vermeiden. Trübung oder schlechte Ergebnisse können auf Verfall hinweisen.

NICHT MITGELIEFERTES, ABER BENÖTIGTES MATERIAL

Kat. Nr. 4063 Kammer

Kat. Nr. 1525 EPS600 Netzteil

Kat. Nr. 5014 Entwicklungsgewicht

Kat. Nr. 4062 Inkubationskammer

Trockenschrank mit Umluft und einer Temperaturleistung von 60...70°C.

Inkubator mit einer Temperaturleistung von 45°C.

Glasplatte

Entfärbelösung: 100ml Eisessig mit 900ml dest. Wasser mischen. In einer fest verschlossenen Flasche aufbewahren.

PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG

Frisches Serum ist das Untersuchungsmaterial der Wahl. Es kann auch Heparin- oder EDTA-Plasma verwendet werden. Oxalat hemmt die LD-Aktivität und sollte daher nicht verwendet werden¹². Plasma sollte frei von Thrombozyten sein, da sie LD enthalten¹³. Proben sollten nach der Entnahme so schnell wie möglich untersucht werden, da es für alle Isoenzyme keine optimale Lagerbedingungen gibt^{12,14,15,16}. Falls erforderlich können die Proben gekühlt bei 15...30°C oder 2...6°C bis zu 48 Stunden aufbewahrt werden¹². NICHT EINFRIEREN – das Einfrieren zerstört die Aktivität der LD-5¹².

Probenentnahme: Bei der Befundung eines MI ist der richtige Zeitpunkt der Probenentnahme für eine genaue Interpretation der LD-Isoenzym-Muster entscheidend. Es sollten mindestens 3 Proben entnommen werden – eine bei der Einweisung, eine 6-13 Stunden danach und eine dritte 24-37 Stunden nach der Einweisung^{2,4}.

Störfaktoren:

- 1) Hämolyse kann die LD-I und LD-2 Quantifizierung beeinträchtigen, da Erythrozyten einen hohen Anteil an LD-Aktivität enthalten^{1,2,12}.
- 2) LD-Aktivität ist urämischen Seren wegen der Anwesenheit von Hemmfaktoren wie Harnstoff und Oxalat reduziert. LD-5 ist besonders beeinträchtigt¹⁷.
- 3) Aceton und Chloroform hemmen alle Isoenzyme bis auf LD-I¹⁴.
- 4) Bestimmte Medikamente können die Aktivität der LD-Isoenzyme beeinflussen¹⁸.

SCHRITT-FÜR-SCHRITT METHODE

1. Das Gel aus der Verpackung nehmen und auf ein Papiertuch legen. Die Geloberfläche mit einem Blotter C blotten und Blotter werfen.
2. Die Auftragschablone so auf das Gel legen, dass die Pfeile am Rand des Gels liegen. Blotter A auf die Schablone legen und mit einem Finger über die Schlitze der Schablone streichen, um eine gute Haftung zu gewährleisten. Blotter A entfernen und ihn bis zur Verwendung in Schritt 5 beiseite legen.
3. 3µl Probe in die jeweiligen Schablonenschlitze pipettieren. Probe für 3 Minuten ins Gel diffundieren lassen.
4. Während die Proben diffundieren, 35ml Puffer in jeden der inneren Bereiche der SAS-MX-Kammer füllen.
5. Nach Absorption der Probe den Blotter A aus Schritt 2 auf die Schablone drücken. Anschließend Schablone und Blotter entfernen.
6. Das Gel in die Kammer spannen, Agarose nach unten, und auf übereinstimmende Polarisierung achten (Pluszeichen auf dem Gel und Pluszeichen in der Kammer).
7. Gel-Elektrophorese durchführen: 100 Volt, 15 Minuten.

8. Während die Elektrophorese läuft, einen mit Wasser angefeuchteten Blotter D in die Inkubationskammer legen und zum Anwärmen in den 45°C warmen Inkubator legen.
9. Ungefähr 3-4 Minuten vor Elektrophorese-Ende ein Fläschchen LD-Isoenzym-Reagenz durch Zugabe von 1ml LD-Isoenzym-Verdünnungspuffer rekonstituieren und gut mischen.
10. Nach der Elektrophorese das Gel mit der Agarose-Seite nach oben auf die Glasplatte legen. Den Inhalt des Fläschchens mit LD-Isoenzym-Reagenz entlang der Anodenseite (+) des Gels gießen.
11. Mit einer Pasteurpipette das Reagenz von der Anodenseite zur Kathodenseite (-) des Gels verteilen. 15 Sekunden warten und das Reagenz zurück auf die Anodenseite verteilen. 15 Sekunden warten und überschüssiges Reagenz von Gel abrollen.
12. Gel in die Inkubationskammer legen. Gel inkubieren: 25 Minuten, 45°C.
13. Das Gel 2 Minuten in Entfärberlösung waschen.
14. Das Gel mit der Agarose-Seite nach oben auf die Glasplatte legen. Blotter B (mit Entfärberlösung angefeuchtet) und 3 gefaltete Papierhandtücher auf die Geloberfläche legen. 3-5 Minuten auf das Gel pressen.
15. Handtücher und Blotter B entfernen und das Gel für 1 Minute in Entfärberlösung legen.
16. Das Gel bei 60...70°C trocknen.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Es wird empfohlen, die Auswertung der Gele gegen Normalwerte vorzunehmen, die für diesen Test in jedem einzelnen Labor ermittelt worden sind. Fertige Gele sollten immer dunkel aufbewahrt werden.

Qualitative Auswertung: Das SAS-MX LD-Isoenzym-Gel kann optisch auf das Vorhandensein oder Fehlen von Banden untersucht werden.

Quantitative Auswertung: Gele bei 595 nm, Schlitz 5 innerhalb 2 Stunde nach Fertigstellung scannen. Fertige Gele sollten immer dunkel aufbewahrt werden.

In der Regel können nach der Elektrophorese 5 Zonen mit LD-Aktivität nachgewiesen werden. Die schnellste Zone (LD-1) hat eine mit den Alpha-I-Globulinen zu vergleichende Wandergeschwindigkeit, und die langsamste Zone (LD-5) ist mit den Gammaglobulinen zu vergleichen. Die anderen 3 Zonen haben eine mittlere Mobilität. Die LD-Aktivität im Serum spiegelt den Abbau zahlreicher Zelltypen wider und können als 5 Zonen beobachtet werden. LD-2 ist vorherrschend, gefolgt von LD-1 und LD-3. LD-4 und LD-5 kommen nur in geringen Mengen vor.

1. LD-2 ist das LD-Isoenzym, dass in größeren Mengen in einem normalen Serum vorkommt^{1,4,12}.
2. LD-1 ist erhöht und kann höher als LD-2 sein bei:
 - a) Myokardinfarkt^{1,4,12}.
 - b) Duchenne'sche Muskelatrophie zeigt ein Bandenmuster wie ein MI; man kann aber anhand der klinischen Symptome beide Erkrankungen leicht differenzieren^{19,20}.
 - c) Hämolyse (einschließlich hämolytischer Anämien) sollte immer in Erwägung gezogen werden, wenn die Gesamt-LD im Serum Werte über das 5-fachen des Normalwerts erreicht, und die Isoenzyme ein höheres LD-1 und LD-2 zeigen. Die Gesamt-LD ist bei einer hämolytischen Anämie viel höher als bei einem MI, es sei denn der MI wird von einem schweren Schock begleitet. Rezidive perniziöse Anämie ergibt ein der Hämolyse ähnliches LD-Muster. Im Zusammenhang mit dieser Erkrankung sind einige der höchsten Gesamt-LD-Werte gefunden worden^{2,14}.
 - d) Niereninfarkt^{2,12}.
3. LD-3 ist bei Lungeninfarzierung erhöht^{7,12,21}.

4. Eine Erhöhung des LD-4 ist mit keinen speziellen pathologischen Krankheitsbildern in Verbindung gebracht worden.
5. LD-5 ist bei Leber- und Muskelverletzungen und Erkrankungen der Haut erhöht¹.
6. Man spricht von einem isomorphen Muster, wenn das Gesamt-LD deutlich erhöht ist, aber alle Isoenzyme normale Prozentwerte haben. Weitgehend divergierende Gruppen klinischer Diagnosen haben diesen Bandenmuster-Typ gezeigt wie kardiorespiratorische Erkrankungen, Malignität, Frakturen, Erkrankungen des zentralen Nervensystems, Infektion und Entzündung, Leberzirrhose, Alkoholismus, Trauma ohne Fraktur, infektiöse Mononukleose, Hypothyreoidismus, Urämie, Nekrose, Pseudomononukleose, Virämie und Ileus^{1,2,22}.
7. LD- und CK-Isoenzyme sind nach kardiochirurgischen Eingriffen weniger spezifisch als in den meisten diagnostischen Situationen. Das CK-MB ist wegen der Verletzung des Myokards durch die Operation und dem Trauma der Manipulation und Punktion des Herzens erhöht. LD-2/LD-1 kann wegen Hämolyse durch den extrakorporalen Kreislauf erhöht sein^{22,24}.

QUALITÄTSKONTROLLE

Die CK/LD-Kontrolle (Kat. Nr. 5134) überprüft alle Phasen der Methode und sollte bei jedem Lauf mitgeführt werden. Zulässige Assay-Werte sind der Packungsbeilage zu entnehmen.

EINSCHRÄNKUNGEN

Die Methode des SAS-MX LD-Isoenzym ist nicht zur Identifikation von Tumor-Markern geeignet.

Siehe PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG für weitere Störfaktoren.

Weitere notwendige Untersuchungen:

1. Die Gesamt-LD-Aktivität kann bestimmt werden. Es gibt widersprüchliche Berichte über den wahren Wert von Gesamtzymbestimmungen und der Schwere einer Krankheit^{1,4,25}.
2. Bei einer MI-Diagnose sollten auch die CK-Isoenzyme bestimmt werden^{1,4}.
3. Zum Ausschluss einer Hämolyse kann als mögliche Ursache eines erhöhten LD-1 und LD-2 das Haptoglobin bestimmt werden.

LITERATUR

1. Brish, L.K. 'CK & LD Isoenzymes A Self-Instructional Text', Am. Soc. of Clin. Path. Press, Chicago, 1984 : 85-120.
2. Hadden, D.M. and Prentiss, T., 'Cardiac Profiling by Electrophoresis', Lab. Mgt., 1977; May: 19-24.
3. Henry, J.D. 'Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods', 16th Edition, 1979; 1: 366-369, W.B. Saunders Co., Philadelphia.
4. Galen, R.S., Reiffel, J.A. and Gambino, S.R., 'Diagnosis of Acute Myocardial Infarction', J. Am. Med. Assoc., 1975; 232(2): 145-147.
5. Frolich, J., Brosseuk, A., Grant, A. and McLennan, M., 'Study of the Value of CPK and LDH Isoenzyme Determinations in the Differential Diagnosis of Ischemic Chest Pain', Clin. Biochem., 1978; 11(6): 232-234.
6. Wagner, G.S., Roe, C.R., Limbird, L.E., Rosati, R.A. and Wallace, A.G., 'The Importance of Identification of the Myocardial-Specific Isoenzyme of Creatine Phosphokinase (MB Form) in the Diagnosis of Acute Myocardial Infarction', Circulation, 1973; 47: 263-269.
7. Nerenberg, S.T., 'Electrophoretic Screening Procedures', 1973: 96-125, Lea & Febiger, Philadelphia.

8. Preston, J.A., Briere, R.O. and Batsakis, J.G., 'Rapid Electrophoretic Separation of Lactate Dehydrogenase Isoenzymes on Cellulose Acetate', *Am. J. Clin. Pathol.*, 1965; 43(3): 256-260.
9. Hsu, M-Y., Kohler, M.M., Barolia, L. and Bondar, R.J.L., 'Separation of Five Isoenzymes of Serum Lactate Dehydrogenase by Discontinuous Gradient Elution from a Miniature Ion-Exchange Column', *Clin. Chem.*, 1979; 25(8) : 1453-1458.
10. Usategui-Gomez, M., Wicks, R.W. and Warshaw, M., 'Immunochemical Determination of the Heart Isoenzyme of Lactate Dehydrogenase(LDH1) in Human Serum', *Clin. Chem.*, 1979; 25(5) : 729-734.
11. Rotenberg, Z., Weinberger, I., Sagie, A., Fuchs, J., Sperling, O. and Agmon, J., 'Lactate Dehydrogenase Isoenzymes in Serum During Recent Acute Myocardial Infarction', *Clin. Chem.*, 1987; 33(8) : 1419-1420.
12. Tietz, N.W. et al., 'Textbook of Clinical Chemistry', 1986: 691-700, W.B. Saunders Co., Philadelphia.
13. Rothwell, D.J., Jendrzyczak, B., Becker, M. and Dumas, B.T., 'Lactate Dehydrogenase Activities in Serum and Plasma', *Clin. Chem.*, 1976; 22(7) : 1024-1026.
14. Latner, A.L. and Skillen, A.W., 'Isoenzymes in Biology and Medicine', 1968: 146-157, Academic Press, London.
15. Kreutzer, H.H. and Fennis, W.H.S., 'Lactic Dehydrogenase Isoenzymes in Blood Serum after Storage at Different Temperatures', *Clin. Chim. Acta*, 1964; 9: 64-68.
16. Galen, R.S., Personal Communication, Dec. 1981.
17. Clark, P.I., Kostuk, W.J. and Henderson, A.R., 'Time-Dependency of Human Lactate Dehydrogenase Isoenzyme 5 Inhibition by Urea', *Clin. Chem.*, 1976; 22(12) : 2059.
18. Young, D.S., 'Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests', 3rd Ed., 1990, AACC Press, Washington D.C.
19. Roses, A.D., Roses, M.J., Nicholson, G.A. and Roe, C.R., 'Lactate Dehydrogenase Isoenzyme 5 in Detecting carriers of Duchenne Muscular Dystrophy', *Neurology*, 1977; 27(May): 414-421.
20. Yasmineh, W.G., Ibrahim, G.A., Abbasnezhad, M. and Awad, E.A., 'Isoenzyme Distribution of Creatine Kinase and lactate Dehydrogenase in Serum and Skeletal Muscle in Duchenne Muscular Dystrophy, Collagen Disease, and Other Muscular Disorders', *Clin. Chem.*, 1978; 24(11) : 1985-1989.
21. Papadopoulos, N.M., 'Clinical Applications of Lactate Dehydrogenase Isoenzymes', *Annals of Clin. Lab. Sci.*, 1977; 7(6): 506-510.
22. Jacobs, D.S., Robinson, R.A., Clark, G.M. and Tucker, J.M., 'Clinical Significance of the Isomorphic Pattern of the Isoenzymes of Serum Lactate Dehydrogenase', *Annals of Clin. and Lab. Sci.*, 1977; 7(5): 411-421.
23. Galen, R.S., 'Diagnostic Tests in Cardiac and Non-Cardiac Disorders' *Diag. Med.*, 1978 Feb., 74-87.
24. Mohiuddin, S.M., Raffetto, J., Sketch, M.H., Lynch, J.D., Schultz, R.D. and Runco, V., 'LDH Isoenzymes and Myocardial Infarction in patients Undergoing Coronary Bypass Surgery: An Excellent Correlation', *Am. Heart J.*, 1976; 92(5): 584-588.
25. Chapelle, J-P., Albert, A., Smeets, J-P., Marechal, J-P., Heusghem, C. and Kulbertus, H.E., 'Does Lactate Dehydrogenase Isoenzyme-5 Contribute to the Predictive Power of Total Lactate Dehydrogenase in Myocardial Infarction?' *Clin. Chem.*, 1983; 29(5) : 774-777.

PRINCIPIO

Il kit per isoenzimi LDH SAS-MX è stato formulato per separare e quantificare gli isoenzimi della lattato deidrogenasi nel siero o nel plasma mediante elettroforesi in gel di agarosio.

La lattato deidrogenasi (LDH) (EC 1.1.1.27) è un enzima riscontrato in pressoché tutti i tessuti umani, con la massima concentrazione a livello del fegato, del muscolo scheletrico, del cuore e dei reni. La vasta distribuzione della LDH nei tessuti corporei limita l'utilità delle determinazioni della LDH totale in fase diagnostica. I test per la determinazione dell'origine di un'elevata attività LDH possono accompagnarsi dalla valutazione degli isoenzimi.

Nel siero umano possono essere osservate la presenza di 5 isoenzimi della LDH. Ogni isoenzima è indicato da un numero, correlato alla sua mobilità elettroforetica. La frazione in più rapido movimento (più anodica) è denominata LDH1 ed è riscontrabile principalmente nel muscolo cardiaco. La frazione con movimento più lento (più catodica) è invece denominata LDH5, riscontrabile principalmente nel fegato e nel muscolo scheletrico. Le altre frazioni, denominate LDH2, LDH3 e LDH4, sono presenti in concentrazioni variabili unitamente alla LDH1 e alla LDH5 in tutti i tessuti^{1,2}. L'impiego più importante degli isoenzimi della LDH interessa la diagnosi dei danni miocardici. La LDH2 presenta la massima concentrazione nel siero umano normale. Il rapporto LDH1/LDH2 è pertanto inferiore a 1. In seguito ad infarto del miocardio (IM), vi è un notevole aumento della LDH1 cosicché il rapporto LDH1/LDH2 successivo a tale evento si avvicinerà o addirittura supererà l'unità; tale fenomeno è noto con il nome di "flipped LD". Il livello di LDH inizia ad aumentare a circa 12-24 ore di distanza dall'infarto miocardico, raggiungendo spesso livelli doppi o tripli (o ancora maggiori) del limite superiore del range normale. L'attività di picco viene solitamente raggiunta il terzo o quarto giorno e può rimanere elevata anche per 2 settimane dopo l'infarto².

I test maggiormente precisi nella diagnosi dell'infarto miocardico vengono compiuti studiando l'isoenzima della creatininchinasi (CK) unitamente agli isoenzimi della lattato deidrogenasi^{1,5}. La specificità e la sensibilità raggiunte con questi due test hanno eliminato la necessità di effettuare ulteriori studi sugli enzimi per giungere ad una diagnosi accurata dell'infarto miocardico. Dagli studi è emerso che le analisi degli isoenzimi CK e LDH, unitamente ad un corretto quadro clinico e ai risultati dell'elettrocardiogramma, offrono una precisione pressoché totale nel diagnosticare adeguatamente l'infarto miocardico^{2,6}.

Gli isoenzimi della LDH sono stati determinati con vari metodi⁷⁻¹¹. L'elettroforesi fornisce tuttavia molte più informazioni rispetto agli altri metodi, in quanto consente una separazione completa di tutti i 5 isoenzimi senza alcun rischio di carryover. Il mezzo di supporto utilizzato nell'elettroforesi comprende cellulosa acetato, agar, agarosio e gel di acrilamide.

Il kit per isoenzimi LDH SAS-MX utilizza una variante del metodo di Preston⁸ e separa gli isoenzimi della lattato deidrogenasi in base alla mobilità in un gel di agarosio. Le bande di isoenzimi vengono quindi visualizzate con un reagente colorimetrico, che visualizza quantitativamente gli isoenzimi in base alla sequenza di reazioni sotto riportata:

I pattern possono essere quantificati per densitometria a 595nm.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Tutti i reagenti devono essere utilizzati esclusivamente per diagnostica in vitro. Non ingerire né pipettare con la bocca i componenti del kit. Indossare guanti protettivi durante l'uso dei componenti del kit. Per le indicazioni relative ai rischi e alla sicurezza e le informazioni sullo smaltimento, fare riferimento alle schede tecniche dei prodotti.

COMPOSIZIONE

1. Gel per isoenzimi LDH SAS-MX (x10)

Contiene agarosio in un tampone barbital con sodio azide come conservante. Il gel è pronto all'uso così come viene fornito.

2. Tampone LDH concentrato (2x 100ml)

Contiene tampone concentrato AMPD, barbital, bicina e aspartato con l'aggiunta di sodio azide come conservante. Diluire l'intero contenuto del flacone a 500ml con acqua distillata e miscelare bene.

3. Reagente per isoenzimi LDH (10x 1ml)

Contiene i componenti necessari all'identificazione degli isoenzimi della lattato deidrogenasi secondo la sequenza di reazioni sopra illustrata. Ved. il paragrafo PROCEDURA per le istruzioni di ricostituzione.

4. Diluente per isoenzimi LDH (1x 15ml)

Contiene tampone AMPD, bicina, barbital e aspartato con pH 8.1 - 8.3 con sodio azide come conservante.

5. Altri componenti del kit

Ogni kit contiene un foglio procedurale, mascherine per l'applicazione dei campioni e blotter A, B, C e D in quantità sufficiente per completare 10 gel.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

1. Gel SAS-MX LD per isoenzima

I gel devono essere conservati a 15...30°C e sono stabili fino alla data di scadenza riportata sulla confezione. NON REFRIGERARE NÉ CONGELARE. Il deterioramento del gel può essere indicato da 1) formazioni cristalline per effetto di congelamento, 2) screpolature e fessurazione per effetto di essiccamento oppure, 3) contaminazione visibile dell'agarosio causata da batteri o funghi.

2. Tampone LDH

Il tampone concentrato deve essere conservato a 15...30°C, è stabile fino a data di scadenza riportata sull'etichetta del flacone. Il tampone diluito è stabile per 2 mesi a 15...30°C. La torbidezza o le scarse prestazioni del tampone diluito possono indicare un suo deterioramento.

3. Reagente per isoenzimi LDH

I flaconi di reagente devono essere conservati a 2...6°C e sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Il reagente ricostituito è stabile per 48 ore a 2...6°C se mantenuto in condizioni di oscurità.

4. Diluente per isoenzimi LDH

Il diluente deve essere conservato a 2...6°C ed è stabile fino a data di scadenza riportata sull'etichetta. Evitare la contaminazione del diluente. La torbidezza o le scarse prestazioni possono indicare un deterioramento.

MATERIALI NECESSARI, MA NON IN DOTAZIONE

Cod. N. 4063 Camera

Cod. N. 1525 Alimentatore EPS600

Cod. N. 5014 Peso di sviluppo

Cod. N. 4062 Camera d'incubazione

Forno di essiccazione ad aria forzata con temperature di 60...70°C

Incubatrice prevista per 45°C.

Piastra in vetro

Soluzione decolorante: Miscelare 100ml di acido acetico glaciale con 900ml di acqua distillata.

Conservare in una bottiglia tappata ermeticamente.

RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE

Il campione ideale è costituito da siero fresco. Può anche essere utilizzato plasma anticoagulato con eparina o EDTA. L'ossalato inibisce l'attività della LDH e pertanto non deve essere utilizzato¹². Il plasma deve essere privo di piastrine, in quanto queste ultime contengono LDH13. I campioni devono essere testati appena possibile dopo la raccolta, in quanto non esistono condizioni di conservazione ottimali per tutti gli isoenzimi^{12, 14, 15, 16}. Se necessario, i campioni possono essere refrigerati a 15...30°C oppure a 2...6°C per un massimo di 48 ore. **NON CONGELARE:** il congelamento distrugge infatti l'attività LDH5¹².

Raccolta dei campioni: Un'adeguata tempestività nella raccolta dei campioni è di cruciale importanza per l'esatta interpretazione dei pattern degli isoenzimi della LDH nella valutazione dell'infarto del miocardio. Devono essere raccolti almeno 3 campioni, di cui uno al momento del ricovero, uno dopo 6-13 ore e il terzo a 24-37 ore di distanza dal ricovero^{2,4}.

Fattori d'interferenza:

- 1) L'emolisi può influire sulle quantificazioni di LDH1 e LDH2, in quanto gli eritrociti contengono livelli elevati di attività LDH^{1,2,12}.
- 2) L'attività LDH appare ridotta nei sieri uremici a causa della presenza di inibitori, quali l'urea e l'ossalato. La LDH5 risulta particolarmente interessata da tali inibitori¹⁷.
- 3) L'acetone e il cloroformio inibiscono tutti gli isoenzimi tranne la LDH1¹⁴.
- 4) Alcuni farmaci possono influenzare l'attività degli isoenzimi della LDH¹⁸.

PROCEDURA

1. Rimuovere il gel dalla confezione e collocarlo su una bibula. Asciugare la superficie del gel con un blotter C e poi eliminarlo.
2. Allineare la mascherina per l'applicazione del campione rispetto alle frecce presenti sul bordo del gel. Porre un blotter A sopra alla mascherina ed effettuare una leggera pressione con le dita sulle fessure per verificare il corretto contatto. Rimuovere il blotter e conservarlo per il passaggio 5.
3. Applicare 3µl di campione in ogni fessura di semina e lasciare assorbire per 3 minuti.
4. Durante l'assorbimento del campione, collocare 35ml di tampone in ogni compartimento interno della camera SAS-MX.
5. Dopo l'assorbimento del campione, asciugare leggermente la mascherina con il blotter A, conservato dal passaggio 2, quindi eliminare mascherina e blotter.
6. Collocare il gel nella camera, con il lato dell'agarosio rivolto verso il basso, e allineando il segno positivo (+) ed il negativo (-) con le corrispondenti posizioni nella camera.
7. Sottoporre il gel ad elettroforesi: 100 Volt per 15 minuti.

8. Mentre i campioni vengono sottoposti ad elettroforesi, collocare un blotter D inumidito con acqua nella camera d'incubazione e sistemare l'incubatrice regolata a 45°C in modo tale da consentirne il bilanciamento.
9. Circa 3-4 minuti prima della conclusione dell'elettroforesi, ricostituire un flacone di reagente per isoenzimi LDH aggiungendo 1 ml di diluente per isoenzimi LDH e mescolando bene.
10. Al termine dell'elettroforesi, mettere il gel su una piastra di vetro con il lato dell'agarosio rivolto verso l'alto. Versare il contenuto del flacone di reagente per isoenzimi LDH lungo il bordo anodico (+) del gel.
11. Utilizzando una pipetta sierologica, spargere il reagente dal bordo anodico al bordo catodico (-) del gel. Attendere 15 secondi e riportare il reagente verso il bordo anodico. Attendere ancora 15 secondi e rimuovere dal gel il reagente in eccesso.
12. Introdurre il gel nella camera d'incubazione. Incubare il gel: 25 minuti a 45°C.
13. Sciacquare il gel nella soluzione decolorante per 2 minuti.
14. Mettere il gel su una piastra di vetro con il lato dell'agarosio rivolto verso l'alto. Collocare un blotter B (inumidito in soluzione decolorante) sulla superficie del gel, seguito da 3 salviette in carta ripiegate. Comprimerne il gel per 3-5 minuti.
15. Rimuovere le salviette e il blotter B e collocare il gel nella soluzione decolorante per un minuto.
16. Asciugare il gel a 60...70°C.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Si raccomanda di effettuare qualsiasi valutazione dei gel sulla base dei valori normali prodotti per questo esame in ogni singolo laboratorio. I gel ottenuti devono essere costantemente conservati al buio.

Valutazione qualitativa: Il gel per isoenzimi LDH SAS-MX può essere ispezionato visivamente per verificare per la presenza o l'assenza di bande d'interesse.

Valutazione quantitativa: Eseguire la scansione dei gel a 595nm, ampiezza slit 5 entro 2 ore dal completamento. I gel ottenuti devono essere costantemente conservati al buio.

In seguito all'elettroforesi, vengono solitamente individuate 5 zone di attività LDH. La zona più rapida (LDH1) si muove con una migrazione simile alle alfa₁-globuline, mentre la zona più lenta (LDH5) si muove con le gammaglobuline. Le altre 3 zone presentano mobilità intermedie. L'attività LDH nel siero rispecchia l'analisi di molti tipi di cellule ed è possibile osservare tutte le 5 zone. La LDH2 è predominante, seguita dalla LDH1 e dalla LDH3. La LDH4 e la LDH5 compaiono in quantità minori.

1. La LDH2 è l'isoenzima della LDH presente in quantità massime nel siero normale^{1,4,12}.
2. La LDH1 è elevata e può essere maggiore della LDH2 nelle seguenti condizioni:
 - a) Infarto del miocardio^{1,4,12}.
 - b) La distrofia muscolare di Duchenne presenta un pattern analogo all'IM, ma i sintomi clinici contribuiscono a distinguere facilmente le due patologie^{19,20}.
 - c) L'emolisi (comprese le anemie emolitiche) devono essere prese in grande considerazione ogniqualvolta la LDH totale nel siero raggiunge livelli superiori a 5 volte i valori normali e gli isoenzimi mostrano maggiori livelli di LDH1 e LDH2. La LDH totale è molto più elevata nell'anemia emolitica di quanto lo sia nell'IM, salvo qualora l'IM sia accompagnato da grave shock. L'anemia perniziosa recidivante fornisce un pattern della LDH simile a quello dell'emolisi; in questa condizione si riscontrano alcuni dei massimi livelli sierici di LDH totale^{2,12}.
 - d) Infarto renale^{2,12}.
3. La LDH3 è elevata negli infarti polmonari^{7,12,21}.
4. L'aumento della LDH4 non è stato associato a patologie particolari.

5. La LDH5 è elevata nei danni epatici e muscolari e nelle malattie cutanee I.
6. Quando la LDH totale risulta notevolmente elevata mentre tutti gli isoenzimi presentano percentuali nella norma, si parla di pattern isomorfo. Gruppi ampiamente divergenti di diagnosi cliniche hanno mostrato questo tipo di pattern; tra di essi rientrano malattie cardiorespiratorie, tumori maligni, fratture, patologie del sistema nervoso centrale, infezioni e infiammazioni, cirrosi epatica, alcolismo, traumi senza fratture, mononucleosi infettiva, ipotiroidismo, uremia, necrosi, pseudo-mononucleosi, viremia ed occlusione intestinale^{1,2,22}.
7. Gli isoenzimi della LDH e della CK sono meno specifici in seguito ad un intervento a cuore aperto rispetto a quanto lo siano nella maggior parte delle situazioni diagnostiche. Il CK-MB aumenterà a causa del danno miocardico dovuto alla procedura di intervento e del trauma causato dalla manipolazione e dall'incannulamento del cuore. Gli isoenzimi LDH2/LDH1 possono essere elevati secondariamente all'emolisi dovuta alla circolazione extracorporea^{22,24}.

CONTROLLO QUALITÀ

Il controllo CK/LDH (Cod. N. 5134) può essere utilizzato per verificare tutte le fasi della procedura e deve essere impiegato su ogni piastra. Fare riferimento alle schede all'interno della confezione per i valori di dosaggio accettabili.

LIMITAZIONI

Il metodo degli isoenzimi LDH SAS-MX non è destinato ad identificare i marker tumorali.

Fare riferimento al paragrafo RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE per altri fattori d'interferenza.

Ulteriori esami necessari:

1. Può essere determinata l'attività LDH totale. Esistono rapporti contrastanti in merito al valore reale dei livelli enzimatici totali nel siero e alla gravità di una malattia^{1,4,25}.
2. Nella diagnosi dell'IM devono essere eseguiti anche gli studi sugli isoenzimi della CK^{1,4}.
3. Possono essere svolti studi sull'aptoglobina, per escludere l'emolisi come causa di elevati livelli di LDH1 e LDH2.

BIBLIOGRAFIA

1. Brish, L.K. 'CK & LD Isoenzymes A Self-Instructional Text', Am. Soc. of Clin. Path. Press, Chicago, 1984 : 85-120.
2. Hadden, D.M. and Prentiss, T., 'Cardiac Profiling by Electrophoresis', Lab. Mgt., 1977; May: 19-24.
3. Henry, J.D. 'Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods', 16th Edition, 1979; 1: 366-369, W.B. Saunders Co., Philadelphia.
4. Galen, R.S. Reiffel, J.A. and Gambino, S.R., 'Diagnosis of Acute Myocardial Infarction', J. Am. Med. Assoc., 1975; 232(2): 145-147.
5. Frolich, J., Brosseuk, A., Grant, A. and McLennan, M., 'Study of the Value of CPK and LDH Isoenzyme Determinations in the Differential Diagnosis of Ischemic Chest Pain', Clin. Biochem., 1978; 11(6): 232-234.
6. Wagner, G.S., Roe, C.R., Limbird, L.E., Rosati, R.A. and Wallace, A.G., 'The Importance of Identification of the Myocardial-Specific Isoenzyme of Creatine Phosphokinase (MB Form) in the Diagnosis of Acute Myocardial Infarction', Circulation, 1973; 47: 263-269.

7. Nerenberg, S.T., 'Electrophoretic Screening Procedures', 1973: 96-125, Lea & Febiger, Philadelphia.
8. Preston, J.A., Briere, R.O. and Batsakis, J.G., 'Rapid Electrophoretic Separation of Lactate Dehydrogenase Isoenzymes on Cellulose Acetate', *Am. J. Clin. Pathol.*, 1965; 43(3): 256-260.
9. Hsu, M-Y., Kohler, M.M., Barolia, L. and Bondar, R.J.L., 'Separation of Five Isoenzymes of Serum Lactate Dehydrogenase by Discontinuous Gradient Elution from a Miniature Ion-Exchange Column', *Clin. Chem.*, 1979; 25(8): 1453-1458.
10. Usategui-Gomez, M., Wicks, R.W. and Warshaw, M., 'Immunochemical Determination of the Heart Isoenzyme of Lactate Dehydrogenase(LDH1) in Human Serum', *Clin. Chem.*, 1979; 25(5): 729-734.
11. Rotenberg, Z., Weinberger, I., Sagie, A., Fuchs, J., Sperling, O. and Agmon, J., 'Lactate Dehydrogenase Isoenzymes in Serum During Recent Acute Myocardial Infarction', *Clin. Chem.*, 1987; 33(8): 1419-1420.
12. Tietz, N.W. et al., 'Textbook of Clinical Chemistry', 1986: 691-700, W.B. Saunders Co., Philadelphia.
13. Rothwell, D.J., Jendrzyczak, B., Becker, M. and Doumas, B.T., 'Lactate Dehydrogenase Activities in Serum and Plasma', *Clin. Chem.*, 1976; 22(7): 1024-1026.
14. Latner, A.L. and Skillen, A.W., 'Isoenzymes in Biology and Medicine', 1968: 146-157, Academic Press, London.
15. Kreutzer, H.H. and Fennis, W.H.S., 'Lactic Dehydrogenase Isoenzymes in Blood Serum after Storage at Different Temperatures', *Clin. Chim. Acta*, 1964; 9: 64-68.
16. Galen, R.S. Personal Communication, Dec. 1981.
17. Clark, P.I., Kostuk, W.J. and Henderson, A.R., 'Time-Dependency of Human Lactate Dehydrogenase Isoenzyme 5 Inhibition by Urea', *Clin. Chem.*, 1976; 22(12): 2059.
18. Young, D.S., 'Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests', 3rd Ed., 1990, AACC Press, Washington D.C.
19. Roses, A.D., Roses, M.J., Nicholson, G.A. and Roe, C.R., 'Lactate Dehydrogenase Isoenzyme 5 in Detecting carriers of Duchenne Muscular Dystrophy', *Neurology*, 1977; 27(May): 414-421.
20. Yasmineh, W.G., Ibrahim, G.A., Abbasnezhad, M. and Awad, E.A., 'Isoenzyme Distribution of Creatine Kinase and lactate Dehydrogenase in Serum and Skeletal Muscle in Duchenne Muscular Dystrophy, Collagen Disease, and Other Muscular Disorders', *Clin. Chem.*, 1978; 24(11): 1985-1989.
21. Papadopoulos, N.M., 'Clinical Applications of Lactate Dehydrogenase Isoenzymes', *Annals of Clin. Lab. Sci.*, 1977; 7(6): 506-510.
22. Jacobs, D.S., Robinson, R.A., Clark, G.M. and Tucker, J.M., 'Clinical Significance of the Isomorphic Pattern of the Isoenzymes of Serum Lactate Dehydrogenase', *Annals of Clin. and Lab. Sci.*, 1977; 7(5): 411-421.
23. Galen, R.S. 'Diagnostic Tests in Cardiac and Non-Cardiac Disorders' *Diag. Med.*, 1978 Feb., 74-87.
24. Mohiuddin, S.M., Raffetto, J., Sketch, M.H., Lynch, J.D., Schultz, R.D. and Runco, V., 'LDH Isoenzymes and Myocardial Infarction in patients Undergoing Coronary Bypass Surgery: An Excellent Correlation', *Am. Heart J.*, 1976; 92(5): 584-588.
25. Chapelle, J-P., Albert, A., Smeets, J-P., Marechal, J-P., Heusghem, C. and Kulbertus, H.E., 'Does Lactate Dehydrogenase Isoenzyme-5 Contribute to the Predictive Power of Total Lactate Dehydrogenase in Myocardial Infarction?' *Clin. Chem.*, 1983; 29(5): 774-777.

USO PREVISTO

El kit SAS-MX LD Isoenzyme está diseñado para la separación y cuantificación de las isoenzimas de la lactato deshidrogenasa en suero o plasma mediante electroforesis en gel de agarosa.

La lactato deshidrogenasa (LDH) (EC 1.1.1.27) es una enzima que se encuentra prácticamente en todos los tejidos humanos, siendo el hígado, el músculo esquelético, el corazón y el riñón los que tienen mayores concentraciones. La amplia distribución de la LDH en los tejidos corporales limita la utilidad de las determinaciones de la LDH total en diagnóstico. Pueden estar indicados los estudios sobre el origen de la actividad elevada de LDH mediante valoración de isoenzimas¹.

Pueden demostrarse cinco isoenzimas de LDH en el suero humano. Cada isoenzima se conoce con un número que está relacionado con su movilidad electroforética. La fracción de movimiento más rápido (la más anódica) se denomina LDH1 y se encuentra fundamentalmente en el músculo cardíaco. La de movimiento más lento (la más catódica) es la LDH5, que se encuentra fundamentalmente en el hígado y el músculo esquelético. Las otras - LDH2, LDH3 y LDH4 se encuentran en diversas cantidades junto con la LDH1 y la LDH5 en todos los tejidos^{1,2}.

El uso más importante de las isoenzimas de la LDH es en el diagnóstico de las lesiones miocárdicas. En el suero humano normal, la LDH2 se encuentra en las mayores concentraciones. Por tanto, el cociente LDH1/LDH2 es menor que uno. Después de un infarto de miocardio (IM), hay una elevación sustancial de la LDH1, de manera que el cociente LDH1/LDH2 después del IM se acercará o incluso superará el 1, un fenómeno conocido como 'vuelco de la LDH'. El nivel de LDH comienza a elevarse aproximadamente 12-24 horas después del infarto de miocardio, alcanzando con frecuencia niveles dos a tres veces (o más) el límite superior de la normalidad. La actividad máxima suele alcanzarse el día 3-4 y la actividad puede seguir elevada durante hasta dos semanas después del infarto².

La prueba más definitiva en el diagnóstico de la IM se consigue realizando estudios de isoenzimas de la creatina cinasa (CK) junto con estudios de las isoenzimas de la LDH de la 1 a la 5. La especificidad y sensibilidad conseguidas con estas dos pruebas ha eliminado la necesidad de realizar más estudios de enzimas para diagnosticar con exactitud un IM. Hay estudios que han demostrado que los análisis de isoenzimas de CK y LDH, junto con un contexto clínico y resultados del electrocardiograma adecuados, son exactos prácticamente en un 100% para diagnosticar adecuadamente un infarto de miocardio^{2,6}.

Se han determinado las isoenzimas de LDH mediante diversos métodos⁷⁻¹¹. La electroforesis proporciona mucha más información que los otros métodos, porque permite la separación completa de las cinco isoenzimas sin riesgo de contaminación entre ellas. El medio de soporte usado en la electroforesis incluye geles de acetato de celulosa, agar, agarosa y acrilamida¹.

El kit SAS-MX LD Isoenzyme utiliza una modificación del método de Preston⁸ y separa las isoenzimas de lactato deshidrogenasa de acuerdo con su movilidad en un gel de agarosa. Luego se visualizan las bandas con un reactivo colorimétrico que visualiza cuantitativamente las isoenzimas de acuerdo con la siguiente secuencia de reacción:

Los patrones pueden cuantificarse por densitometría a 595 nm.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Todos los reactivos son exclusivamente para uso diagnóstico in-vitro. No ingerir ni chupar con la boca ningún componente del kit. Usar guantes para manejar todos los componentes del kit. Consultar la hoja con los datos de seguridad del producto acerca de los riesgos de los componentes, avisos de seguridad y consejos para su eliminación.

COMPOSICIÓN

1. Gel del SAS-MX LD Isoenzyme (x10)

Contiene agarosa en un tampón de barbital con azida de sodio como conservante. El gel viene envasado listo para usar.

2. Concentrado tampón para LDH (2x 100ml)

Contiene AMPD concentrado, barbital, bicina y tampón aspartato con azida sódica como conservante. Diluir el contenido del frasco en 500ml de agua destilada y mezclar bien.

3. Reactivo de LD Isoenzyme (10x 1ml)

Contiene los compuestos necesarios para identificar de las isoenzimas de la lactato deshidrogenasa de acuerdo con la secuencia de reacción que ya hemos mostrado anteriormente. Véanse las instrucciones de reconstitución en el PROCEDIMIENTO PASO A PASO.

4. Diluyente del LD Isoenzyme (1x 15ml)

Contiene AMPD, bicina, barbital y tampón aspartato, pH 8,1 – 8,3 con azida sódica como conservante.

5. Otros componentes del kit

Cada kit contiene una hoja de instrucciones y suficientes plantillas de aplicación de la muestra y secantes A, B, C y D, hasta completar 10 geles.

ALMACENAMIENTO Y PERÍODO DE VALIDEZ

1. Gel del SAS-MX LD Isoenzyme

Los geles han de almacenarse a una temperatura entre 15...30°C y permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en el envase. NO REFRIGERAR NI CONGELAR. El deterioro del gel se puede identificar por: 1) apariencia cristalina, indicativo de que el gel ha sido congelado, 2) agrietamiento y descamación, indicativo del resecamiento del gel, o 3) contaminación visible de la agarosa por fuentes bacterianas o micóticas

2. Tampón para LDH

El concentrado tampón debe almacenarse a una temperatura entre 15...30°C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del frasco. El concentrado tampón diluido permanece estable durante 2 meses a una temperatura entre 15...30°C. Turbiedad o un mal comportamiento del tampón diluido pueden ser indicios de deterioro.

3. Reactivos del LD Isoenzyme

Los viales de reactivos deben almacenarse a 2...6°C y permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. El reactivo reconstituido es estable durante 48 horas a 2...6°C si se mantiene en la oscuridad.

4. Diluyente del LD Isoenzyme

El diluyente debe guardarse a una temperatura entre 2...6°C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Evite la contaminación del diluyente. Si hay turbidez o mal rendimiento, puede indicar deterioro.

ARTÍCULOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

Nº de catálogo 4063 Cámara

Nº de catálogo 1525 Fuente de alimentación EPS600

Nº de cat. 5014 Peso de desarrollo

Nº de catálogo 4062 Cámara de Incubación

Horno de secado con ventilación forzada con capacidad de 60...70°C

Incubador con capacidad de 45°C

Plato de vidrio

Solución decolorante: Mezclar 100ml de acético cristalizado con 900ml de agua destilada. Guardar en un frasco herméticamente cerrado.

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

La muestra elegida es suero recién recogido. El plasma anticoagulado con heparina o EDTA puede usarse también, el oxalato inhibe la actividad de LDH y no debe usarse¹². El plasma no debe contener plaquetas, puesto que las plaquetas contienen LDH¹³. Las muestras deben estudiarse cuanto antes después de su recogida, puesto que ningunas condiciones de conservación son óptimas para todas las isoenzimas^{12, 14, 15, 16}. Si es necesario, las muestras pueden conservarse refrigeradas a 15...30°C o 2...6°C durante hasta 48 horas¹². **NO CONGELAR** – la congelación destruye la actividad de la LDH5¹².

Recogida de muestras: La selección del momento adecuado de recogida de muestras es fundamental para la interpretación exacta de los patrones de isoenzimas de LDH en la valoración del IM. Debe recogerse un mínimo de 3 muestras – una al ingreso, una 6-13 horas más tarde y la tercera 24-36 horas después del ingreso^{2,4}.

Factores que interfieren:

- 1) La hemólisis puede afectar a las cuantificaciones de LDH1 y LDH2, porque los eritrocitos contienen niveles elevados de actividad de LDH^{1,2,12}.
- 2) La actividad de la LDH está reducida en sueros urémicos, debido a la presencia de inhibidores como la urea y el oxalato. La LDH5 se ve especialmente afectada¹⁷.
- 3) La acetona y el cloroformo inhiben todas las isoenzimas excepto la LDH1¹⁴.
- 4) Determinados fármacos pueden afectar a la actividad de isoenzimas de LDH¹⁸.

PROCEDIMIENTO PASO A PASO

1. Sacar el gel del envase y colocarlo sobre una toallita de papel. Secar la superficie del gel con un secante C y luego desechar el secante.
2. Alinear la plantilla de aplicación de la muestra con las flechas existentes en el borde del gel. Aplicar un secante A sobre la parte superior de la plantilla y frotar con un dedo a lo largo de las rejillas para asegurar un buen contacto. Retirar el secante y conservarlo para utilizarlo luego en el paso 5.
3. Aplicar 3µl de muestra en cada ranura y dejar que absorba durante 3 minutos.
4. Mientras la muestra es absorbida, verter aproximadamente 35ml del concentrado tampón en cada hueco interior de la cámara SAM-MX.
5. Finalizada la absorción de la muestra, secar la plantilla con el secante A que se ha conservado del paso 2, retirar el secante y la plantilla.
6. Colocar el gel en la cámara con la agarosa hacia abajo, alineando los lados positivo (+) y negativo (-) con las posiciones correspondientes en la cámara.
7. Realizar la electroforesis del gel: 100 voltios, 15 minutos
8. Mientras se está realizando la electroforesis, colocar un secante D humedecido con agua en la cámara de incubación y colocarlo en el incubador a 45°C para que se equilibre.

9. Aproximadamente 3-4 minutos antes del final de la electroforesis, reconstituir un vial de reactivo de isoenzimas de LDH añadiendo 1 ml de diluyente de isoenzimas LDH y mezclar bien.
10. Después de la electroforesis, colocar el gel con la agarosa hacia arriba sobre la placa de vidrio. Verter los contenidos del vial de reactivo de isoenzimas de LDH a lo largo del borde del ánodo (+) del gel.
11. Usando una pipeta serológica, extender el reactivo desde el borde del ánodo hasta el borde del cátodo (-) del gel. Esperar 15 segundos y extender el reactivo nuevamente al borde del ánodo. Esperar 15 segundos y retirar del gel el exceso .
12. Colocar el gel en la cámara de incubación. Incube el gel: 25 minutos, 45°C.
13. Lavar el gel en la solución decolorante durante 2 minutos.
14. Colocar el gel con la agarosa hacia arriba sobre el plato de vidrio. Colocar un secante B (humedecido en solución decolorante), 3 toallitas de papel dobladas sobre la superficie del gel. Presionar el gel durante 3-5 minutos.
15. Retire las toallitas y el secante B y coloque el gel en la solución decolorante durante 1 minuto.
16. Secar el gel a una temperatura entre 60...70°C.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Se recomienda realizar cualquier evaluación de los geles con respecto a valores normales obtenidos para este test en cada laboratorio individual. Los geles completados deben conservarse en la oscuridad en todo momento.

Evaluación cualitativa: El gel del SAS-MX LD Isoenzyme puede inspeccionarse visualmente en cuanto a la presencia o ausencia de bandas de interés.

Evaluación cuantitativa: Estudie los geles a 595nm, hendidura 5 en las 2 horas siguientes a la terminación. Los geles terminados deben almacenarse en la oscuridad en todo momento.

Después de la electroforesis, normalmente se detectan 5 zonas de actividad de LDH. La zona más rápida (LDH1) se mueve con una migración similar a las alfa I-globulinas y la zona más lenta (LDH5) se mueve con las gamma-globulinas. Las otras 3 zonas tienen movilidades intermedias. La actividad de la LDH en el suero refleja la degradación de numerosos tipos celulares y pueden verse las 5 zonas. Predomina la LDH2, seguida por la LDH1 y la LDH3. Se producen LDH4 y LDH5 en cantidades pequeñas.

1. La LDH2 es la isoenzima de LDH presente en mayores cantidades en el suero normal^{1,4,12}.
2. La LDH1 está elevada y puede ser mayor que la LDH2 en:
 - a) Infarto de miocardio^{1,4,12}.
 - b) La distrofia muscular de Duchenne presenta un patrón parecido al IM, pero los síntomas clínicos ayudan a diferenciar fácilmente las dos enfermedades^{19,20}.
 - c) Debe valorarse con cuidado la posibilidad de hemólisis (incluidas las anemias hemolíticas) siempre que la LDH sérica total alcance niveles mayores de 5 veces los normales y las isoenzimas muestren una LDH1 y una LDH2 mayores. La LDH total es mucho mayor en la anemia hemolítica que en el IM a menos que el IM se acompañe de shock grave. La anemia perniciosa en recaída da un patrón de LDH como el de la hemólisis y algunos de los niveles séricos totales de LDH se encuentran en este trastorno^{2,14}.
 - d) Infarto renal^{2,12}.
3. La LDH3 está elevada en los infartos pulmonares^{7,12,21}.
4. La elevación de la LDH4 no se ha asociado a ninguna patología concreta.
5. La LDH5 está elevada en las lesiones hepáticas y musculares y en las enfermedades de la piel¹.

6. Cuando la LDH total está notablemente elevada pero todas las isoenzimas tienen porcentajes normales, esto se denomina patrón isomórfico. Grupos muy variables de diagnósticos clínicos han demostrado este tipo de patrón y entre ellos están las enfermedades cardiorrespiratorias, los tumores malignos, las fracturas, las enfermedades del sistema nervioso central, la infección y la inflamación, la cirrosis hepática, el alcoholismo, el traumatismo sin fractura, la mononucleosis infecciosa, el hipotiroidismo, la uremia, la necrosis, la pseudomononucleosis, la viremia y la obstrucción intestinal^{1,2,22}.
7. Las isoenzimas LDH y CK son menos específicas después de la cirugía a corazón abierto que en la mayoría de las situaciones diagnósticas. La CK-MB estará elevada debido al daño miocárdico por el procedimiento quirúrgico y al traumatismo producido por la manipulación y canulación del corazón. El cociente LDH2/LDH1 puede estar elevado debido a la hemólisis por la circulación extracorpórea²²⁻²⁴.

CONTROL DE CALIDAD

El Control de CK/LDH (Nº de catálogo 5134) puede usarse para verificar todas las fases del procedimiento y debe usarse en cada prueba. Para obtener los valores apropiados de los ensayos, consultar el folleto adjunto en el envase.

LIMITACIONES

El método SAS-MX LD Isoenzyme no está diseñado para identificar marcadores tumorales.

Consúltese RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS para conocer otros factores de interferencia.

Otras pruebas adicionales necesarias son:

1. Puede determinarse la actividad de LDH total. Existen informes contradictorios sobre el valor verdadero de los niveles séricos enzimáticos totales y la gravedad de una enfermedad^{1,4,25}.
2. Al diagnosticar un IM, deben realizarse también estudios de las isoenzimas de la CK^{1,4}.
3. Pueden realizarse estudios de la haptoglobina para descartar una hemólisis como causa de elevación de LDH1 y LDH2.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brish, L.K. 'CK & LD Isoenzymes A Self-Instructional Text', Am. Soc. of Clin. Path. Press, Chicago, 1984: 85-120.
2. Hadden, D.M. and Prentiss, T., 'Cardiac Profiling by Electrophoresis', Lab. Mgt., 1977; May: 19-24.
3. Henry, J.D. 'Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods', 16th Edition, 1979; 1: 366-369, W.B. Saunders Co., Philadelphia.
4. Galen, R.S., Reiffel, J.A. and Gambino, S.R., 'Diagnosis of Acute Myocardial Infarction', J. Am. Med. Assoc., 1975; 232(2): 145-147.
5. Frolich, J., Brosseuk, A., Grant, A. and McLennan, M., 'Study of the Value of CPK and LDH Isoenzyme Determinations in the Differential Diagnosis of Ischemic Chest Pain', Clin. Biochem., 1978, 11(6): 232-234.
6. Wagner, G.S., Roe, C.R., Limbird, L.E., Rosati, R.A. and Wallace, A.G., 'The Importance of Identification of the Myocardial-Specific Isoenzyme of Creatine Phosphokinase (MB Form) in the Diagnosis of Acute Myocardial Infarction', Circulation, 1973; 47: 263-269.

7. Nerenberg, S.T., 'Electrophoretic Screening Procedures', 1973: 96-125, Lea & Febiger, Philadelphia.
8. Preston, J.A., Briere, R.O. and Batsakis, J.G., 'Rapid Electrophoretic Separation of Lactate Dehydrogenase Isoenzymes on Cellulose Acetate', *Am. J. Clin. Pathol.*, 1965; 43(3): 256-260.
9. Hsu, M-Y., Kohler, M.M., Barolia, L. and Bondar, R.J.L., 'Separation of Five Isoenzymes of Serum Lactate Dehydrogenase by Discontinuous Gradient Elution from a Miniature Ion-Exchange Column', *Clin. Chem.*, 1979; 25(8) : 1453-1458.
10. Usategui-Gomez, M., Wicks, R.W. and Warshaw, M., 'Immunochemical Determination of the Heart Isoenzyme of Lactate Dehydrogenase(LDH1) in Human Serum', *Clin. Chem.*, 1979; 25(5) : 729-734.
11. Rotenberg, Z., Weinberger, I., Sagie, A., Fuchs, J., Sperling, O. and Agmon, J., 'Lactate Dehydrogenase Isoenzymes in Serum During Recent Acute Myocardial Infarction', *Clin. Chem.*, 1987; 33(8) : 1419-1420.
12. Tietz, N.W. et al., 'Textbook of Clinical Chemistry', 1986: 691-700, W.B. Saunders Co., Philadelphia.
13. Rothwell, D.J., Jendrzyczak, B., Becker, M. and Doumas, B.T., 'Lactate Dehydrogenase Activities in Serum and Plasma', *Clin. Chem.*, 1976; 22(7) : 1024-1026.
14. Latner, A.L. and Skillen, A.W., 'Isoenzymes in Biology and Medicine', 1968: 146-157, Academic Press, London.
15. Kreutzer, H.H. and Fennis, W.H.S., 'Lactic Dehydrogenase Isoenzymes in Blood Serum after Storage at Different Temperatures', *Clin. Chim. Acta*, 1964; 9: 64-68.
16. Galen, R.S., Personal Communication, Dec. 1981.
17. Clark, P.I., Kostuk, W.J. and Henderson, A.R., 'Time-Dependency of Human Lactate Dehydrogenase Isoenzyme 5 Inhibition by Urea', *Clin. Chem.*, 1976; 22(12) : 2059.
18. Young, D.S., 'Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests', 3rd Ed., 1990, AACC Press, Washington D.C.
19. Roses, A.D., Roses, M.J., Nicholson, G.A. and Roe, C.R., 'Lactate Dehydrogenase Isoenzyme 5 in Detecting carriers of Duchenne Muscular Dystrophy', *Neurology*, 1977; 27(May): 414-421.
20. Yasmineh, W.G., Ibrahim, G.A., Abbasnezhad, M. and Awad, E.A., 'Isoenzyme Distribution of Creatine Kinase and lactate Dehydrogenase in Serum and Skeletal Muscle in Duchenne Muscular Dystrophy, Collagen Disease, and Other Muscular Disorders', *Clin. Chem.*, 1978; 24(11) : 1985-1989.
21. Papadopoulos, N.M., 'Clinical Applications of Lactate Dehydrogenase Isoenzymes', *Annals of Clin. Lab. Sci.*, 1977; 7(6): 506-510.
22. Jacobs, D.S., Robinson, R.A., Clark, G.M. and Tucker, J.M., 'Clinical Significance of the Isomorphic Pattern of the Isoenzymes of Serum Lactate Dehydrogenase', *Annals of Clin. and Lab. Sci.*, 1977; 7(5): 411-421.
23. Galen, R.S., 'Diagnostic Tests in Cardiac and Non-Cardiac Disorders' *Diag. Med.*, 1978 Feb., 74-87.
24. Mohiuddin, S.M., Raffetto, J., Sketch, M.H., Lynch, J.D., Schultz, R.D. and Runco, V., 'LDH Isoenzymes and Myocardial Infarction in patients Undergoing Coronary Bypass Surgery: An Excellent Correlation', *Am. Heart J.*, 1976; 92(5): 584-588.
25. Chapelle, J-P., Albert, A., Smeets, J-P., Marechal, J-P., Heusghem, C. and Kulbertus, H.E., 'Does Lactate Dehydrogenase Isoenzyme-5 Contribute to the Predictive Power of Total Lactate Dehydrogenase in Myocardial Infarction?' *Clin. Chem.*, 1983; 29(5) : 774-777.

Helena Biosciences Europe
Queensway South
Team Valley Trading Estate
Gateshead
Tyne and Wear
NE11 0SD

Tel: +44 (0) 191 482 8440
Fax: +44 (0) 191 482 8442
Email: info@helena-biosciences.com
www.helena-biosciences.com

HL-2-1305P 2008/01 (7)