**MASTER**

**APLICATII MODERNE ALE MEDICINEI DE LABORATOR IN PERSONALIZAREA ACTULUI MEDICAL (AMMLPAM)**

**Anul univ. 2019/2020 Anul 1/Sem 2**

# Tehnici avansate în analiza biochimică a fluidelor biologice

**ŞL.Dr. Camelia GURBAN**
**Email: gurban.camelia@umft.ro**

# 1. Specimene biologice. Pregătirea materialului biologic în vederea analizelor de laborator. Centrifugarea în laboratorul clinic

# ANALIZELE MEDICALE

Analizele efectuate în laboratorul de analize medicale , ca şi celelalte tipuri de analize medicale, sunt solicitate de medicii clinicieni în diferite **scopuri**:

- diagnostic;
- prognostic;
- de evaluare a stadiului bolii;
- de monitorizare a tratamentului.

Pentru a fi utile în aceste scopuri, **rezultatele analizelor de laborator trebuie**, în primul rând, sa fie reale.

# ETAPELE PRELUĂRII (FLUXUL) PROBELOR BIOLOGICE ÎN LABORATORUL CLINIC

**Probele de laborator** folosite pentru investigaţii paraclinice **sunt**:

- **Sângele** recoltat prin puncţie venoasă à jeun sau de urgenţă;
- **Urina spontană, diureza** (urina/24ore, cu preluarea unui esantion, notarea volumului de urina),
- **Lichidele biologice**: de ascită, pleural, amniotic, etc,
- **LCR, Scaun**; etc

**Identificarea probelor** (în camera de recepţie a laboratorului de analize medicale):

- Toate probele recoltate sunt inscripţionate cu o **eticheta** care cuprinde un *cod de bara specific fiecarui pacient* cu *datele de identitate ale pacientului* (nume, prenume, sex, varstă), sectia de unde provin probele, *data si ora recoltarii*.
- Toate probele recoltate sunt insotite de un **buletin de analize** care cuprinde *aceleasi date mentionate mai sus* plus *analizele solicitate de medic*.

**Repartizarea probelor** pe sectoarele laboratorului**: urgente, biochimie, hematologie, coagulare, imunologie, urini, microbiologie,** etc...

# FAZELE PROCESULUI DE TESTARE

Procesul de testare a probelor biologice este un proces complex, ce poate fi divizat în trei faze importante:

**1. faza preanalitică;**

**2. faza analitică;**

**3. faza postanalitică**

**Faza preanalitică:**

**Prelucrarea probelor biologice**

- identificarea şi înregistrarea probelor biologice în laborator - registru unic de evidenţă a pacienţilor, sistem informatic;
- prelucrarea prin centrifugare şi decantare;
- separarea serului/plasmei de elementele figurate ale sângelui (dacă testarea efectivă nu este posibilă imediat);
- observarea prezenţei unor interferenţi (hemoliza, lipemia, icterul).

# CENTRIFUGAREA

**Centrifugarea** este o operaţie care permite separarea rapidă a componentelor cu **densităţi diferite**, aflate în amestec sub forma unei **suspensii într-o fază lichidă**.

**Timpul de centrifugare**, necesar sedimentării particulei, depinde de:

- ng (invers proporţional);
- dimensiunea particulelor (invers proporţional);
- vâscozitatea mediului (direct proporţional);
- diferenţa de densitate particulă - lichid (invers proporţional).

Produsul dintre timpul de sedimentare şi multiplii de acceleraţie (ng) este **constant**: **t x ng = constant**

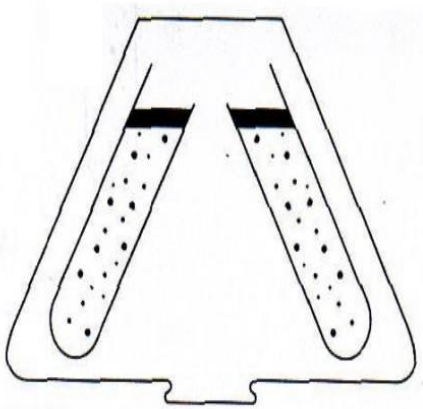
=> **crescând** de un anumit număr de ori **acceleraţia** = **timpul** de sedimentare se **scurtează** de acelaşi număr de ori.

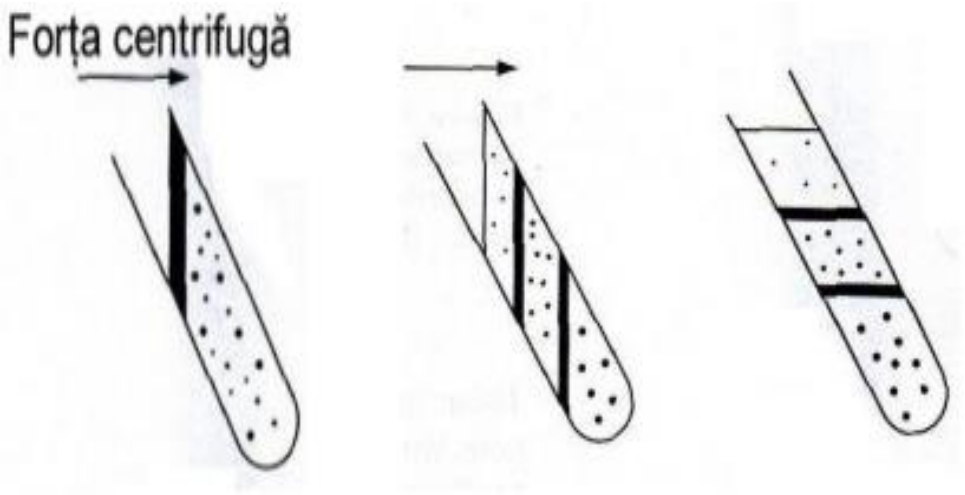
# CENTRIFUGA DIN LABORATORUL MEDICAL

**Centrifugile cu rotor unghiular** se caracterizează prin faptul că suporturile pentru probe se află **înclinate faţă de axul de rotaţie cu un unghi fix de 14°- 40°**.

Majoritatea centrifugilor actuale utilizează acest tip de rotor, care prezintă o serie de **avantaje:**

- Forma rotorului **este aerodinamică** permiţând atingerea unor turaţii mari.
- **Particulele** din suspensie au un **drum mai scurt de parcurs.**
- Înclinaţia face **ca particulele să alunece** pe pereţii vasului, cu frecare mai redusă





# SPECIMENE BIOLOGICE

**Sângele** este constituit din **plasmă** şi **elemente figurate**. El **realizează legătura** între **toate celulele organismului,** astfel că **orice modificare** a **compoziţiei** sale semnalează un **dezechilibru** la nivel tisular.

**Plasma:**

- este o soluţie apoasă cu **capacitate puternică** de **soluţie tampon** şi **izoosmotică** cu mediul intracelular;
- reprezintă 55-60% din volumul sanguin;
- se obţine prin centrifugarea unui eşantion de **sânge recoltat pe un anticoagulant**;
- în urma procesului de centrifugare se **separă 2 faze:**

- una **superioară** care este un **lichid uşor opac, uşor gălbui**, alcătuit din: apă, substanţe anorganice (ioni de sodiu, potasiu, calciu, magneziu, fosfat, clorură, zinc, fier, bicarbonat, etc.), substanţe organice azotate (proteine, enzime, uree, acid uric, creatinină, bilirubină, hemoglobină, etc.) şi substanţe organice neazotate (glucoză, colesterol, trigliceride, acizi graşi liberi, fosfolipide, etc.), numit **PLASMĂ** (care **conţine fibrinogen**) şi

- un **sediment** format din **elementele figurate ale sângelui**.

# SPECIMENE BIOLOGICE (2)

**Serul:**

- este o probă biologică obţinută din **sângele recoltat fără anticoagulant** şi lăsat să staţioneze la temperatura camerei;
- în urma acestui proces sângele va coagula, putându-se **separa 2 faze:**
  - o **fază superioară lichidă, transparentă, alb-gălbuie**, numită **SER** (care **nu conţine fibrinogen**) şi
  - un **sediment** numit **coagul**.

**Elementele figurate ale sângelui:**

- reprezintă 40-45% din volumul sanguin;
- sunt reprezentate de hematii, leucocite şi trombocite.

***SERUL = PLASMA – FIBRINOGEN***

**Plasma sanguina** - 55% din volumul sanguin
91% apa
7% proteine (albumina, globuluine, fibrinogen)
2% nutrienti (aminoacizi, glucide, lipide), hormoni, electroliti

**Strat leuco-trombocitar**

**Strat eritrocitar**

## Dispozitive (vacuteinere) utilizate în recoltarea sângelui:

| Nr. crt. | TIP DOP/ CULOARE | CARACTERISTICI | UTILIZARE |
|---|---|---|---|
| 1. | ROŞU GALBEN | - **FĂRĂ substanţă anticoagulantă** ± gel accelerator de fibrină,<br>- **SE CENTRIFUGHEAZĂ:**<br>10 min / 2000 rpm sau 5 min / 2500 rpm | **Ser - BIOCHIMIE** (uree, creatinina, acid uric, bilirubina, glucoza, colesterol, enzime, etc).<br>**Ser - IMUNOLOGIE** (markeri imunologici, tumorali, hormoni) |
| 2. | ALBASTRU | - **cu substanţă anticoagulantă* Citrat Na 3.2%,**<br>- **SE CENTRIFUGHEAZĂ ÎNCET**: 15 min/1500 rpm | **Plasma bogată în trombocite - FACTORI AI COAGULARII** (FBG, TQ, INR, APTT, PT) |
| 3. | VERDE | - **cu substanţă anticoagulantă* Heparinat de litiu**<br>- **SE CENTRIFUGHEAZĂ**: 10 min/2000 rpm sau 5 min/2500 rpm | **Plasma - BIOCHIMIE URGENŢĂ** (metaboliţi, electroliţi şi enzimele cu *excepţia amoniacului sânguin şi a fosfatazei acide)* |
| 4. | MOV | - **cu substanţă anticoagulantă* EDTA-K/Na,**<br>- **NU SE CENTRIFUGHEAZĂ** | **Sânge - HEMATOLOGIE**: (Hb, HLG) şi BIOCHIMIE: **HbA1c- glicozilată** |
| 5. | NEGRU | - **cu substanţă anticoagulantă* Citrat de Na 3.2%,**<br>- **NU SE CENTRIFUGHEAZĂ** | **Sânge - VSH** |
| 6. | GRI | - **cu substanţă anticoagulantă* Florura Na 1%,**<br>- **SE CENTRIFUGHEAZĂ: 10 min/2000 rpm sau 5 min / 2500rpm** | **Plasma - BIOCHIMIE**<br>(det. **Glicemiei în ± DZ**) |

# INTERFERNŢA ANTICOAGULANŢILOR

| ANTICOAGULANTUL | ANALIZA | REACŢIA |
|---|---|---|
| **Fluorura Na** | Ureea | Inhibă ureaza |
| **EDTA** | Fosfataza alcalină | Inhibiţie |
| | Creatin fosfokinaza | Inhibiţie |
| | Calciu | Reducere |
| **Heparinat de litiu** | Fosfataza acidă | Inhibiţie |
| | Tiroxina | Reducere |
| | **Triiodotironina** | **Creştere** |
| **Oxalaţi** | Insulina | Reducere |
| | Amilaza | Inhibiţie |
| | Lactat dehidrogenaza | Inhibiţie |
| | Fosfataza acidă | Inhibiţie |
| | Fosfatul anorganic | Reducere |

# Dispozitive (vacuteinere) utilizate în recoltarea sângelui (2):

*** În vacutainere pentru recoltarea probelor de sânge care conţin anticoagulant raportul anticoagulant/sânge recoltat în vacuteiner este = 1/9!**

---

## ORDINEA RECOLTARILOR:

1. Hemocultura (daca exista)!
2. **VSH (vacutainer dop NEGRU)**
3. **COAGULARE (vacuteiner dop ALBASTRU)**
4. **HLG + HbA1c (vacuteiner dop MOV)**
5. **BCH URGENTA (vacuteiner dop VERDE)**
6. **BCH a jeun + ELFO proteine, Imunologie, hormoni, vitamine, markeri tumorali, (vacutainer dop ROSU)**
7. **Glicemie la DZ (vacutainer cu dop GRI)**

# Principalele analize de utilitate clinică sunt:

## A jeun biochimie:

**SER (vacuteiner cu dop ROŞU)** sau **PLASMA (vacuteiner cu dop VERDE)** cu analizorul automat folosind metodele biochimice fotocolorimetrice enzimatice:

- Glicemie,
- Uree, Creatinina, Acid uric;
- Proteine totale,
- ALAT, ASAT,
- Bilirubina directa, Bilirubina totala,
- Amilaza, Lipaza, Colinesteraza;
- ALP, GGT,
- CK, CK-MB, LDH
- Colesterol, Trigliceride, LDL-col, HDL-col
- Ionograma: Na, K, Bicarbonat, Ca total, Ca ionic, Magneziu, Fier (Sideremie, Iron), Clor.

## A jeun SER (vacuteiner cu dop ROŞU):

- **ELFO** proteine (principiul electroforezei),
- **Hormoni** (TSH, FT4, PSA) cu analizorul automat folosind tehnica **imunoenzimatică ELISA**),
- **Markeri tumorali** (AFP, CA125, ACE, PSA, etc) cu analizorul automat folosind tehnica imunoenzimatică ELISA),
- **Markeri specifici**: cistatina C, feritina, vit.B12, folat, etc cu analizorul automat folosind tehnica imunoenzimatică ELISA),
- **Imunologie**: ASLO, FR, CRP, hsCRP, etc cu analizorul automat folosind tehnica imunoenzimatică ELISA).

# Principalele analize de utilitate clinică sunt (2):

**SÂNGE:**

- **Hemoleucograma-HLG (vacuteiner cu dop MOV)**: analizorul de hematologie (principiul citometriei de flux),
- **Coagulograma** (PT, APTT, INR, FIB) **vacuteiner cu dop ALBASTRU**: analizorul automat (metoda turbidimetrica);
- **Markeri CV** (TROPO, MIO, CK-MB, BNP, D-Dimer) **vacuteiner cu dop MOV**: folosind Panoul Alere Triage Profiler SOB (principiul imunofluorescentei),
- **ASTRUP direct seringa cu capac verde** (cu heparinat Litiu): analizorul de gaze sanguine ASTRUP ABL 800 FLEX.

**URINA**:

- **Examenul biochimic al urinii** (cititor automat de bandelete) + sedimentul urinar (centrifugare);
- **Amilaza urinara** cu analizorul automat folosind metodele biochimice foto-colorimetrice enzimatice,
- **Sedimentul ADDIS** (recipiente colectoare).

**VSH** (vacuteiner cu dop NEGRU)

**ALTE LICHIDE:** pleural, de ascită, amniotic, LCR, etc (recipiente speciale): glucoza, Cl, LDH, Amilaza;

**SCAUN:** hemoragii oculte, proba digestie, paraziţi (coprorecoltor).

# Surse de erori în determinările biochimice efectuate pe plasmă şi ser

## 1. Prerecoltare:

- alimentaţia pacientului (recoltarea se face după un **post alimentar de cel puţin 10 ore**, cafeina creşte glucoza şi scade timpul Quick);
- **medicaţia** administrată (acidul ascorbic interferă cu determinarea glucozei);
- **felul sângelui recoltat** (glucoza are valori mai mici în sângele venos decât în sângele arterial, piruvatul şi lactatul au valori mai mari în sângele venos faţă de cel arterial);
- recoltarea de pe **cateter este interzisă**;
- **anticoagulantul** folosit.

## 2. Postrecoltare:

- **timpul prelungit** scurs de la recoltare şi până la efectuarea determinării;
- **conservarea necorespunzătoare** a serului sau a plasmei;
- hemoliza
- plasma sau serul icteric
- plasma sau serul lipemic.

# Surse de erori în determinările biochimice efectuate pe plasmă şi ser (2)

## 2. Postrecoltare:

- **hemoliza (liza hematiilor)** importantă pentru: **LDH, ACP, ALAT, ASAT, potasiu, bilirubină, colesterol**. **Hemoliza poate apărea** în: stări patologice, recoltare defectuoasă a sângelui, separarea defectuoasă a elementelor figurate de ser sau plasmă;
- **plasma sau serul icteric.** Culoarea caracteristică acestora interferă semnificativ în determinările colorimetrice care se efectuează în domeniul **400-500 nm** (se face o probă martor a serului de a cărei extincţie se ţine seama la determinare);
- **plasma sau serul lipemic.** Când concentraţia **lipidelor** neutre din ser depăşeşte valoarea de **700 mg/dl**, **serul apare opalescent sau lactescent**. Dacă opalescenţa nu dispare în cursul determinării, citirea extincţiei la spectrofotometru va fi eronată (se face o probă martor a serului de a cărei extincţie se ţine seama la determinare). **Ca urmare se fac diferite diluţii ale serului/plasmei analizate!!**

# Conservarea serului sau a plasmei sanguine

- se recomandă ca analizele biochimice să se efectueze pe ser sau plasmă provenite din **sânge proaspăt recoltat;**
- la temperatura laboratorului, **timp de 4-6 ore de la recoltare**, nu se produc modificări notabile ale concentraţiei metaboliţilor şi ale activităţii enzimelor;
- serul sau plasma se pot **conserva la +4°C timp de 24-36 ore**, fără să se producă modificări semnificative;
- pentru o conservare mai îndelungată serul şi plasma **se congelează sau se liofilizează**.

# 2. Metode optice de analiză. Spectrofotometria.

# Metode optice de analiză - generalităţi

- Această categorie de metode de analiză se bazează pe **proprietăţile optice** ale sistemului studiat, manifestate în **cursul excitării acestuia**, respectiv **interacţiunii cu energia radiantă de toate lungimile de undă**.
- Caracteristica principală a acestor metode este faptul că **semnalul de ieşire** în majoritatea cazurilor şi cel de intrare este de natură optică.
- Metodele se caracterizează în primul rând prin natura **interacţiunii sistemului** cu **energia excitantă**, cât şi prin modul de observare a fenomenelor optice rezultate. Ambele caracteristici depind în marea măsură de natura semnalului de intrare.
- Metodele optice de analiză se folosesc la **determinări de concentraţii**, în rutina clinică, elucidări de mecanisme de reacţie, studii cinetice, lămurirea unor aspecte structurale în cadrul cercetărilor biochimice propriu zise.

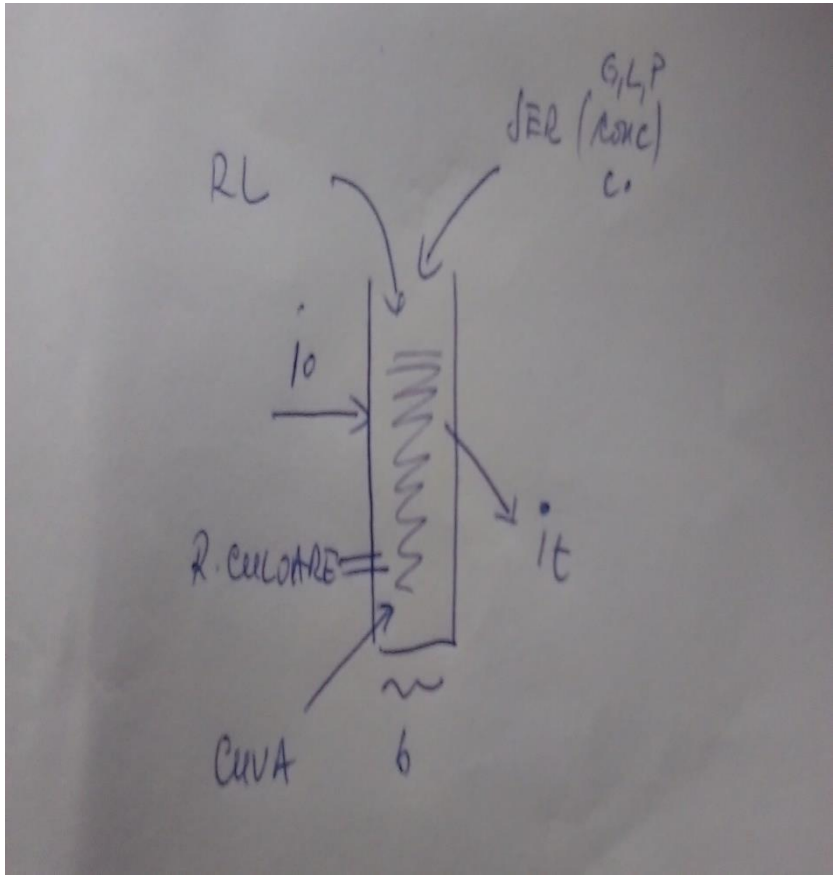
# Spectrofotometria - generalităţi

- Una dintre cele mai utilizate metode optice de analiză este **spectrofotometria**.
- Analiza are la bază două legi fundamentale. Aceste legi se aplică în cazul **modificării puterii radiante a unei radiaţii monocromatice** odată cu **modificarea grosimii** (**b**) stratului străbătut de radiaţie şi **modificarea concentraţiei** (**C**).
- Atunci cand **radiatia luminoasa este transmisă printr-un mediu**, **intensitatea ei scade datorită absorbţiei**, reflexiei şi difuziei.
- Contribuţia celor trei fenomene la slăbirea intensităţii radiaţiei este foarte diferită. Experimental se realizează astfel de condiţii când **reflexia** şi **difuziunea** sunt **neglijabile** şi în această situaţie vorbim de **absorbţiede radiaţie**.

# Legile absorbţiei radiaţiilor

**1. Legea Bouguer-Lambert:** pe măsură ce **creşte grosimea** unei probe absorbante**, intensitatea radiaţiei transmisă** prin probă **descreşte**.

- Dacă notăm **cu $I_o$ intensitatea radiaţiei incidente**, cu **$I_t$ a celei** transmise şi cu **b grosimea stratului absorbant**, între acele valori se stabilește urmatoarea relație: $I_t = I_o \times 10^{-k \cdot b}$
- Raportul **$I_t$ / $I_o$** se numeşte **transmitanţă** şi se notează cu **T**. Transmitanţa este un indiciu al puterii absorbante a mediului.



## 2. Legea Bouguer-Lambert-Beer

- Cologaritmul transmitanţei se numeşte **absorbanţă** (**A**-densitate optică) sau **extincţia** mediului (**E**) (**cele două mărimi A şi E sunt sinonime**).

$$A = k \cdot b,$$ unde k este coeficientul de extincţie

- Aceasta este o altă formă de exprimare a legii Bouguer-Lambert: **absorbanţa (extincţia) este proporţională cu grosimea stratului absorbant**.

- Dependenţa absorbţiei de concentraţie se exprimă prin legea lui Beer: coeficientul de extincţie este proporţional cu concentraţia (**C**).

$$k = a \cdot C$$

- Factorul de proporţionalitate ***a*** se numeşte ***absorbtivitatea*** substanţei (***C*** se exprimă în grame/litru). Expresia legii combinate a lui **Bouguer-Lambert-Beer** este:

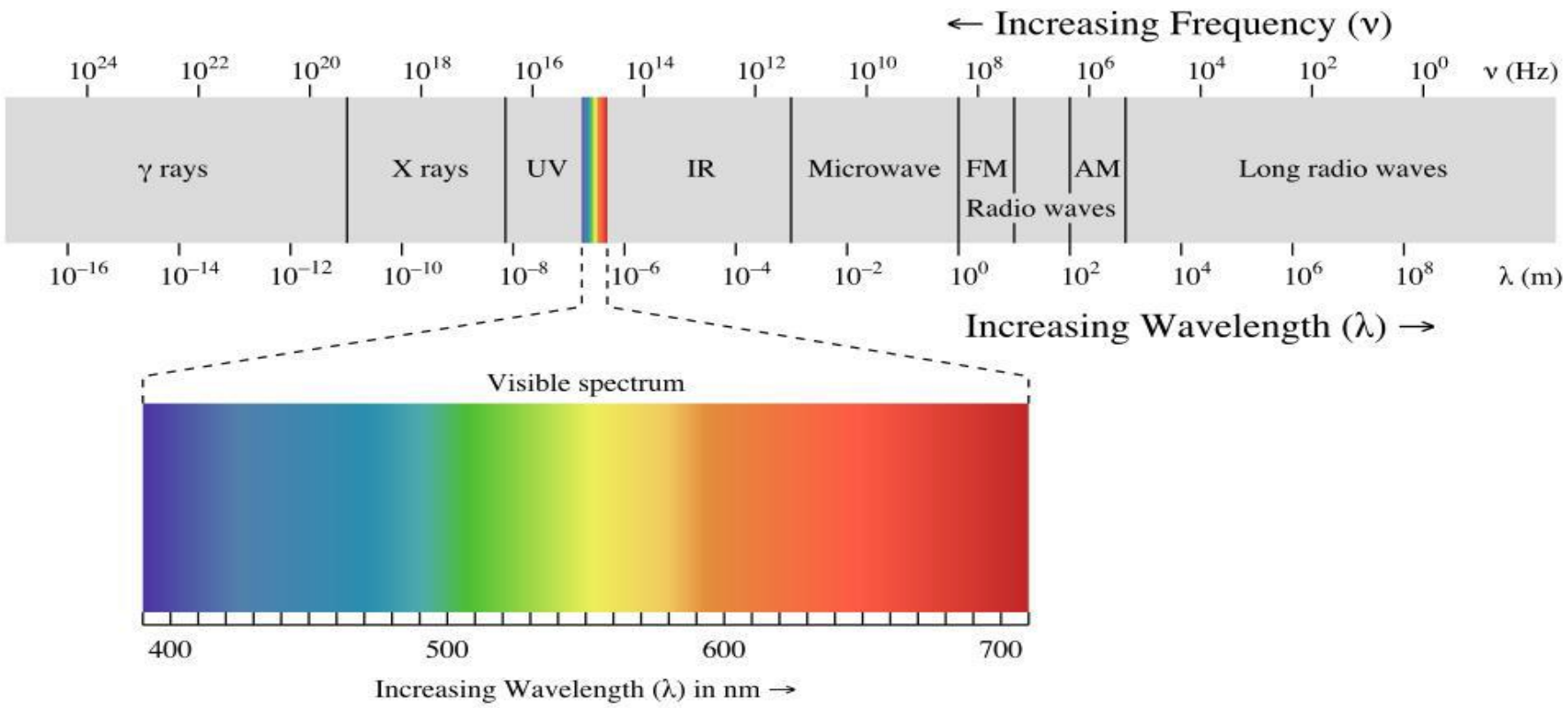
$$A = a \cdot C \cdot b$$

- Absorbtivitatea $a = A / (C \cdot b)$ reprezintă extincţia unei soluţii având concentraţia de 1 gram/litru la o grosime de strat de 1 centimetru.

# Spectrometru

**Aparatul** utilizat în spectrofotometrie poartă denumirea de **spectrometru** conține următoarele componente de

- sursa de radiaţie;
- selectorul de bandă (monocroma
- cuve pentru introducerea probei (sistemul de introducerea probei);
- detectorul de radiaţie.




**Domeniul vizibil al spectrului** reprezintă partea relativ îngustă cu lungimile de undă cuprinse între **400 nm (violet) şi 760 nm (roşu),** care produc senzaţia de lumină în ochiul omului.

# Componentele/probele folosite la analiza spectrofotometrică

- **PROBA MARTOR** are în componenţă ,,**a”µl reactiv de lucru +**

  **,,b” µl  apă distilată** (de concentraţie = 0 zero)

  => **Em = 0** ; se etaloneaaza aparatul la 0 (zero) => se apasa pe Auto zero;

- **PROBA STANDARD** are în componenţă ,,**a”µl reactiv de lucru +**

  **,,b” µl soluţie standard** (de concentraţie = fixă) => **Es** care **se citeşte la spectrofotometru**;

- **PROBA DE ANALIZAT** are în componenţă ,,**a”µl reactiv de lucru +**

  **,,b” µl  probă ser/plasmă/sânge/urină** (de concentraţie = necunoscută) => **Ep care se citeşte la spectrofotometru**;

**3. Cofactori enzimatice.**

**METODA TESTULUI OPTIC (determinarea transaminazelor).**

**EVALUAREA FILTRATULUI GLOMERULAR (FG)**

# I. COFACTORI ENZIMATICI

- Enzimele sunt **biocatalizatori** organici cu mare specificitate.
- Marea lor **majoritate au structură proteică** şi doar puţine prezintă structură polinucleotidică.
- Din punct de vedere **structural,** enzimele proteice se împart în două clase:

  - **holoenzime**, cu structură strict proteică;

  - **heteroenzime** care, pe lângă partea proteică, numită **apoenzimă,** prezintă şi o altă componentă, neproteică, numită **cofactor enzimatic** şi **fără de care enzima nu prezintă activitate catalitică.**

# CLASIFICAREA cofactorilor enzimatici

**Cofactorii** aparţin, la rândul lor, la trei categorii:

- **ioni metalici**, care intervin direct în procesul de cataliză enzimatică (ex. $Cu^{2+}$, $Fe^{2+}$, $Fe^{3+}$, $Mg^{2+}$, $Mo^{2+}$, $Se^{2+}$, $K^{+}$, $Zn^{2+}$);
- **coenzime** - au structură organică, dar **neproteică**. Sunt *legaţi slab de apoenzimă* şi pot fi uşor mobilizaţi, putând fi practic separaţi de enzimă. *Se mai numesc şi al doilea substrat sau cosubstrat*. *Majoritatea sunt vitamine (acidul ascorbic)* sau derivate de vitamine (*$NAD^{+}$, $NADP^{+}$* - de la niacină, *Coenzima A* - de la acidul pantotenic, tetrahidrofolatul - de la acidul folic, tiaminpirofosfatul - de la tiamină) sau de la alţi compuşi (*ATP, ADP*, GTP, tetrahidrobiopterina - de la GTP);
- **grupări prostetice** - au structură organică, dar **neproteică.** Sunt legate covalent de partea proteică a enzimei. *Regenerarea lor se face in situ*. Majoritatea sunt *vitamine (biotina)* sau *derivate de vitamine (FMN şi FAD* - de la riboflavină, dezoxiadenozil-*cobalamina* şi metil-cobalamina - de la cobalamină, *piridoxal fosfat* - de la piridoxină sau de la alţi compuşi (*acidul lipoic*).

# II. TESTUL OPTIC

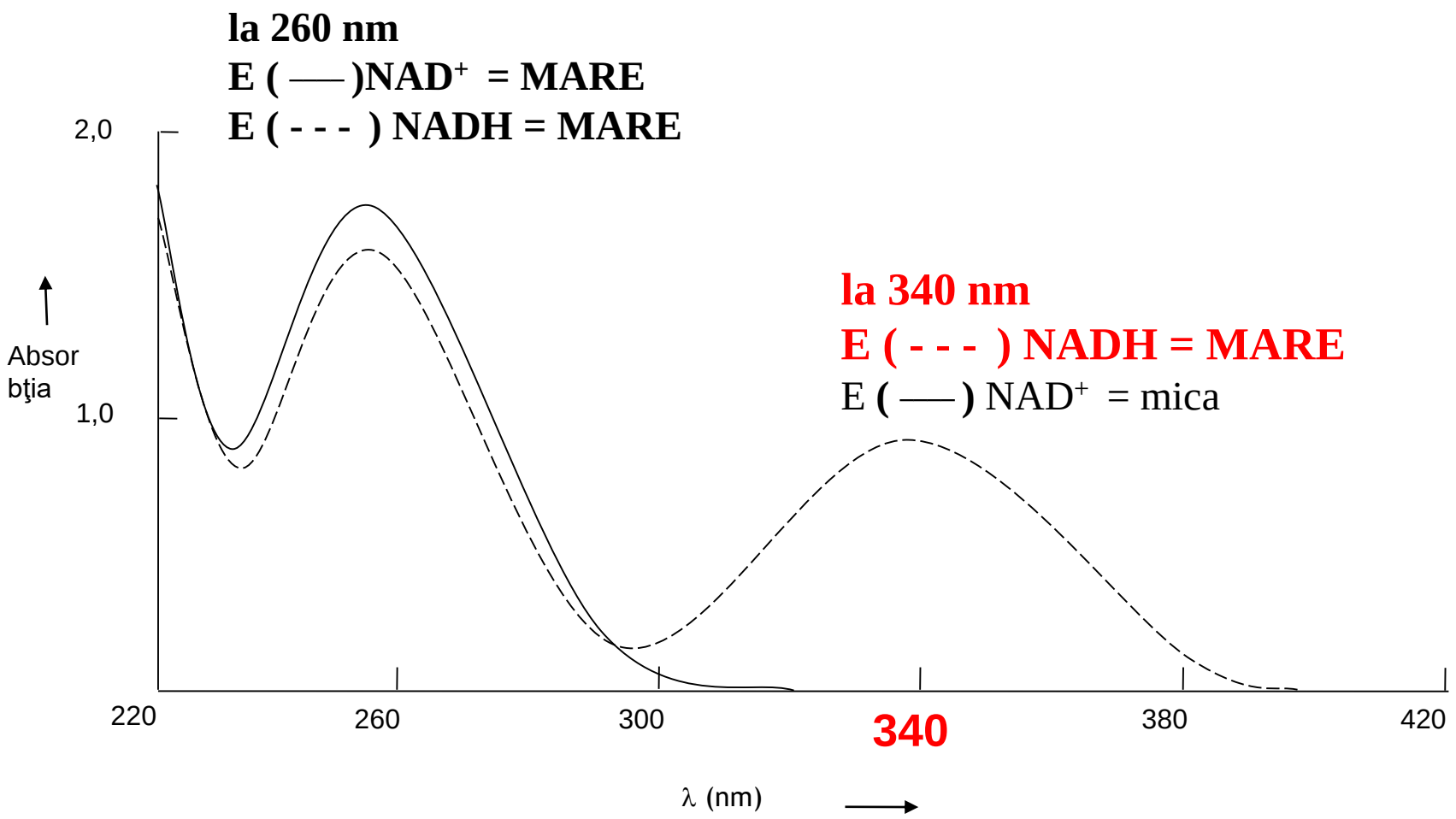
- Este folosit la **determinarea activităţii enzimelor** implicate în **transferul de hidrogen**.

- Este aplicabil în cazul enzimelor care au **cofactor un derivat de niacină**, $NAD(P)^+$ sau NAD(P)H.

- În principiu se măsoară **direct oxidarea NAD(P)H sau reducerea $NAD(P)^+$**

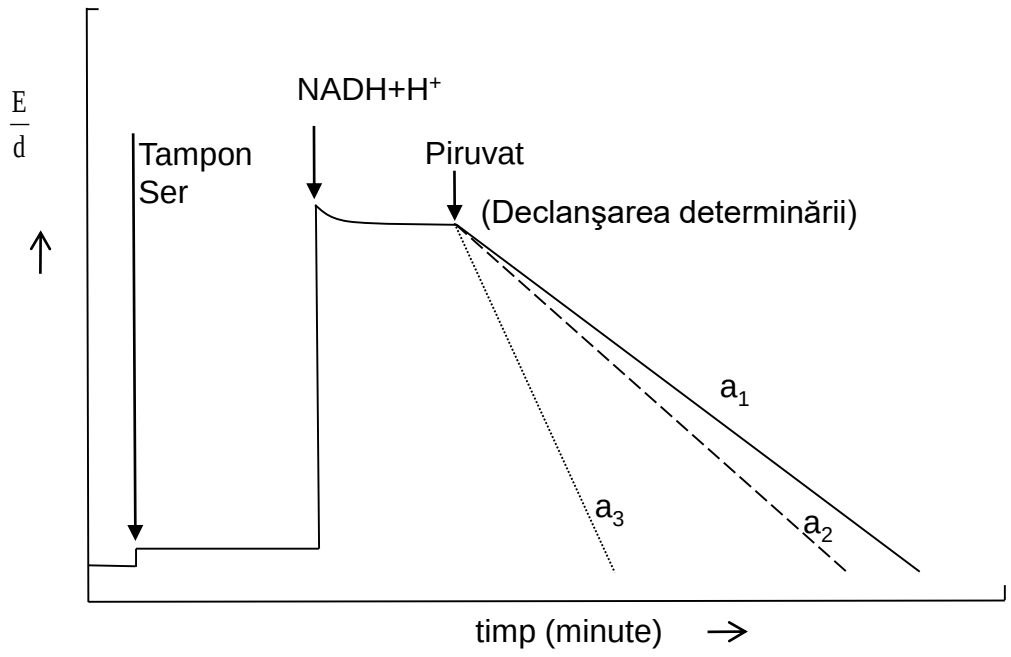
$$XH_2 + NAD^+ \longrightarrow X + NADH + H^+$$

# Spectrul de absorbţie al $NAD^+$ şi NADH



# PRINCIPIUL TESTULUI OPTIC

- În toate aceste determinări se urmăreşte modificarea absorbţiei în timp la ***340 nm*.**
- La adăugarea **coenzimei reduse (NADH), absorbţia creşte rapid** şi la aproximativ un minut devine staţionară.
- Se declanşează reacţia prin adăugarea substratului respectiv şi se înregistrează diminuarea absorbţiei care este proporţională (liniară) cu activitatea enzimei respective, până la **epuizarea coenzimei NADH (aproximativ 3-4 minute).**
- Astfel **ΔE/min (diminuarea absorbţiei pe minut) este direct proporţională cu activitatea enzimei cercetate**.



## Variantele tehnice ale testului optic

**a. Testul optic simplu** - dacă enzima pe care o determinăm necesită prezenţa de $NAD^+$ sau NADH, reacţia se efectuează între substrat, **enzimă (prezentă în ser),** coenzimă şi se urmăreşte variaţia absorbţiei pe un interval de timp stability.

$$\text{piruvat} + \text{NADH} + H^+ \underset{\text{pH=9.0}}{\overset{\text{pH=7.5}}{\rightleftharpoons}} \text{lactat} + NAD^+$$

# Lactat dehidrogenaza (LDH) - generalităţi

Catalizează oxidarea reversibilă a L-lactatului la piruvat.

LDH este foarte răspândită, fiind prezentă în aproape *toate ţesuturile*, dar mai ales în ficat, miocard, rinichi, muşchi scheletici, eritrocite, plămâni.

Este un tetramer alcătuit din două tipuri de subunităţi, H şi M.

Se cunosc 5 izoenzime:

- $LDH_1$ ($H_4$) = 17-27%,
- **$LDH_2$ ($H_3M$) = 29-39%,**
- $LDH_3$ ($H_2M_2$) = 19-27%,
- $LDH_4$ ($HM_3$) = 8-16%
- $LDH_5$ ($M_4$).= 6-16%.

**$LDH_1$** şi **$LDH_2$** predomină în miocard (predomina $LDH_1$), eritrocite şi rinichi.

**$LDH_3$** se găseşte mai ales în plămâni, splină, pancreas şi placentă.

**$LDH_4$** şi **$LDH_5$** îşi au originea în ficat şi muşchii scheletici (predomina $LDH_5$).

# LDH - generalităţi

Izoenzimele pot fi sarate prin electroforeză:

- $LDH_1$ şi $LDH_2$ migrează rapid spre anod,
- $LDH_4$ şi $LDH_5$ migrează lent.

Diferenţiate pe baza unor proprietăţi fizice:

- $LDH_1$ = *termostabilă,*
- $LDH_5$ = *termolabilă,*

proprietăţi chimice: $LDH_1$ are *afinitate mai mare* pentru *α-hidroxibutirat*, fiind denumită şi *α-hidroxibutirat dehidrogenază* sau folosind *anticorpi specifici.*

## *Valori de referinţă:*

- **M**: **135 - 225** U/L
- **F**: **125 - 215** U/L
- **nn: 225 - 600** U/L

# LDH totală - crescută patologic

Infarctul miocardic acut: creşte *mai târziu decât CK => 12-16 h* şi *revine la normal după 8-14 zile*.

Infarctul pulmonar: LDH *creşte în primele 24 h, înaintea ASAT*.

Afecţiuni hepatice: necroze toxice, hepatite virale, ciroză.

Anemii: megaloblastice, hemolitice.

Neoplazii: boala Hodgkin, leucemii, cancere pulmonare, abdominale, seminoame, teratoame testiculare, etc.

LDH se foloseşte pentru a diferenţia o pleurezie neoplazică de alte pleurezii (cele neoplazice LDH în lichidul pleural > LDH serică).

Afecţiuni musculare: distrofii musculare, traumatisme.

Pancreatită acută.

Infarct renal.

Alte cauze: exerciţii fizice intense, naştere, hemoliza, afecţiuni dermatologice, medicamente (β-blocante, cefalosporine, oxacilină, tetraciclină, biseptol, aspirină).

# Izoenzimele LDH - creşteri patologice

**1. Creşterea $LDH_1$ şi $LDH_2$**

**IMA:** izoenzimele "cardiace" încep să crească la 8-12 ore de la debut (mai **ales $LDH_1$, cu inversarea rap.$LDH_1/LDH_2$ > 2**), ating valorile maxime după 48-72 de ore şi revin la normal după 8-14 zile;

**Anemii megaloblastice, Anemii hemolitice (în special a $LDH_2$ ) .**

Infarct renal.

**2. Creşterea $LDH_3$** apare în:

Limfoame maligne, leucemii, alte neoplazii - special în stadiile avansate - dacă nivelul LDH scade = tratate cu succes, fiind un indicator al *eficacităţii terapiei.*

Infarct pulmonar, Pneumonie.

Pancreatită acută.

**3. Creşterea $LDH_4$** şi **$LDH_5$** are loc în:

**Afecţiuni hepatice (în special a $LDH_4$)**

**Traumatisme musculare (în special a $LDH_5$).**

# b. Testul optic cuplat cu o reacţie indicatoare

**Determinarea glutamat-piruvat transaminazei (GPT)** constă în două etape:

- etapa I - enzima de măsurat - **GPT**, catalizează reacţia:

$$\text{L-alanină + acid } \alpha\text{-cetoglutaric} \rightleftharpoons \text{acid piruvic + acid glutamic}$$

Piruvatul rezultat (activitatea directă a GPT) constituie substratul pentru a doua reacţie, $NAD^+$-dependentă.

- etapa a II-a - reacţia indicatoare (prin **LDH**):

$$\text{piruvat + NADH + } H^+ \rightleftharpoons \text{lactat + } NAD^+$$

- Fiecare moleculă de **piruvat va oxida NADH trecându-l în $NAD^+$** odată cu formarea de lactat.
- Reacţia se realizează în cuva spectrofotometrului în care se introduce tampon, LDH, L-alanină şi ser (sursa de enzimă - GPT).
- După adăugarea coenzimei reduse, **NADH, absorbţia creşte rapid**, urmează stabilizarea absorbţiei (aproximativ un minut), după care se declanşează reacţia prin adăugarea $\alpha$-cetoglutaratului. Urmează diminuarea absorbţiei.
- Deoarece concentraţia NADH-ului este direct proporţională cu concentraţia substratelor enzimei urmărite (GPT), variaţia absorbţiei este direct proporţională cu activitatea enzimei.
- **Determinarea *GPT în ser este un indicator fidel al stării funcţionale hepatice.***

## Determinarea glutamat-oxalacetat transaminazei (GOT) - enzima este prezentă *în ficat şi miocard*:

- etapa I – enzima de determinat **GOT** care catalizează reacţia:

$$\text{L-aspartat + acid } \alpha\text{-cetoglutaric} \rightleftharpoons \text{acid oxalacetic + acid glutamic}$$

- etapa a II-a - reacţia indicatoare prin enzima malat dehidrogenază (**MDH**) $NAD^+$-dependentă:

$$\text{oxalacetat + NADH+ } H^+ \rightleftharpoons \text{malat + } NAD^+$$

Concentraţia serică a enzimei GOT este un indicator pentru integritatea **funcţiei hepatice** şi a celei **miocardice.**

# Transaminazele:

**Glutamic-piruvic transaminaza (GPT)** sau alanin aminotransferaza (**ALAT**, **ALT**)
**Glutamic-oxaloacetic transaminaza (GOT)** sau aspartat aminotransferaza (**ASAT**, **AST**)

Enzime ce catalizează interconversiunea aminoacizilor în α-cetoacizii corespunzători prin transferul grupării amino.

**ALAT** se găseşte în concentraţia cea mai mare în ficat, existând în concentraţii *mai reduse şi în muşchii scheletici, miocard şi rinichi.*

**ASAT** se găseşte în concentraţii descrescătoare: miocard, ficat, muşchi scheletici, rinichi şi hematii.

**ALAT** - localizare *citoplasmatică,* **ASAT** are două izoenzime, una cu localizare *mitocondrială şi una citoplasmatică*. În *leziunile uşoare*, apare în ser izoenzima citoplasmatică, pe când cea mitocondrială se găseşte în *leziunile severe.*

*Creşteri fiziologice ale ASAT* se întâlnesc la nou-născuţi şi copii.

Probele *hemolizate produc rezultate fals crescute*.

# VALORI NORMALE = VALORI REFERINTA

| ALAT (GPT) Vârstă/sex | VN = VR (U/L) |
|---|---|
| 0-12 luni | 10 - 71 |
| 1-3 ani | 10 - 31 |
| 4-6 ani | 10 - 36 |
| 7-12 ani | 10 - 44 |
| 13-17 ani | 10 - 45 |
| **F: >17 ani** | **10 - 33** |
| **M: >17 ani** | **10 - 41** |

| ASAT (GOT) Vârstă/sex | VN=VR (U/L) |
|---|---|
| 0-12 luni | 10 - 96 |
| 1-3 ani | 10 - 71 |
| 4-6 ani | 10 - 53 |
| 7-12 ani | 10 - 50 |
| 13-17 ani | 10 - 46 |
| **F: >17 ani** | **10 - 32** |
| **M: >17 ani** | **10 - 40** |

# ALAT şi ASAT - Creşteri patologice

## 1. Bolile hepatice:

- Bolile hepatice cu leziuni hepatocitelor (**sindromul citoliză hepatică**) se însoţesc de creşteri ale activităţii ALAT şi ASAT în ser.

  - creşteri încă din perioada *prodromală*, înainte de apariţia simptomelor, cum ar fi icterul.

- **Raportul de Rittis ASAT/ALAT normal = 1,2 – 1,3** pentru a diferenţia afecţiunile inflamatorii hepatice, de alte cauze ale necrozei hepatice:

  - *hepatite virale raport ASAT/ALAT<1* prin *creşterea* marcată ***ALAT*** **(predomină leziunile inflamatorii,** cu creşterea permeabilităţii membranei hepatocitelor → ser apare ALAT şi apoi izoenzima citosolică a ASAT);

  - *necrozele toxice raportul ASAT/ALAT >1,5* (prin **eliberarea în circulaţie** şi a izoenzimei **mitocondriale ASAT**):

    - *raportul ASAT/ALAT > 2 = hepatite etanolice;*
    - *raportul ASAT/ALAT > 3 = ciroza biliara primara*

# ALAT şi ASAT - creşteri patologice (2)

## 1. Bolile hepatice (2):

- Creşteri foarte mari - *intoxicaţiile cu solvenţi organici* (tetraclorură de carbon).
- Creşteri moderate apar după consumul de *alcool* (mai ales ASAT) şi după administrarea unor de medicamente (*opiacee, neuroleptice, anticonvulsivante, anticoagulante, antibiotice, sulfamide, salicilaţi, paracetamol*, etc).
- *Valori extrem de ridicate* (>10000 UI/L, **ASAT > ALAT**) se întâlnesc în **sindromul alcool-acetaminofen (*paracetamol*).**

- Hepatita cronică persistentă transaminazele sunt *intermitent crescute,* iar în cea agresivă valorile sunt *ridicate*, dar nu ating nivelul din hepatita acută. La fel ca în hepatita acută , ALAT>ASAT.
- Ciroze transaminazele pot fi normale sau prezintă doar *creşteri uşoare* în cursul puseurilor evolutive, datorită *reducerii masei de hepatocite*.
- În colestază pot să apară *creşteri moderate* ale transaminazelor.
- Carcinoamele hepatice primare nu determină modificări semnificative, în schimb metastazele tumorale hepatice pot produce *creşteri moderate.*
- Determinarea repetată a ASAT este utilă în detectarea rejetului după transplantul hepatic.

# ALAT şi ASAT - creşteri patologice (3)

## 2. ALTE BOLI: CARDIACE, MUSCULARE:

- Infarctul miocardic acut: activitatea ASAT creşte în primele 12-14 h -debut, atinge valorile maxime după 20-30 h şi se normalizează după 2-6 zile. Creşterile pot atinge 4-10 x LSN.
- ALAT nu creşte de regulă în IMA.
- O creştere a ALAT după un IMA sugerează *o insuficienţă ventriculară dreaptă cu stază hepatică.*
- Afecţiuni musculare: *distrofia musculară progresivă* şi *dermatomiozita* produc creşteri ale ASAT. În *traumatisme severe (strivire)* valorile ASAT pot atinge *10-15 x LSN*.
- *Creşteri uşoare sau moderate ale ASAT* mai pot fi întâlnite în:
  - Embolia pulmonară;
  - Pancreatita acută;
  - Gangrenă;
  - Anemii hemolitice.

**Scăderea bruscă a unor valori mari ale transaminazelor = prognostic rezervat (Insuficienta Hep., I.Cardiaca congestiva) = epuizarea substratului celular (hepatocite, miocard)!**

# III. EVALUAREA FILTRATULUI GLOMERULAR (FG)

- **Creatinina serică** nu este un marker foarte sensibil, deoarece concentraţia ei nu depăşeşte limita superioară a intervalului de referinţă decât atunci când FG scade sub 50%;

- **Ureea** nu este cel mai bun indicator al FG, deoarece peste 50% din ureea filtrată se reabsoarbe pasiv sau cu ajutorul transportorilor de uree la nivel tubular, procentul fiind cu atât mai mare cu cât debitul urinar este mai scăzut;

- Măsurarea **microalbuminuriei** este importantă în managementul pacienţilor cu **diabet zaharat**, cu risc mare de a dezvolta **nefropatie**, pacienţii cu diabet de tipul I: 30-45%, iar pacienţii cu diabet de tipul II: 30%;

- Concentraţii ale **albuminei urinare** în intervalul **50-200 mg/24** ore sunt sugestive pentru nefropatia diabetică.

# Evaluarea filtratului glomerular (FG)

- Prin noţiunea de **clearance de creatinina** se înţelege deci **volumul de plasmă (ml) epurat din o anumită substanţă, la nivel renal, într-un minut** şi se calculează din relaţia:

**Clearance (ml/min) = (U x V)/(P x 1440)**

Unde:

- U = cantitatea de creatinină eliminată în urina de 24 de ore (în mg/24 ore);
- V = volumul de urină pe 24 ore (în mL);
- P = concentraţia creatininei în ser (mg/100mL);
- 1440 = numărul de minute din 24 de ore.

- **Parametrii echilibrului acido-basic: RA, Na, K,**

# Intervale de referinţă:

**Ureea:**

- **Ser/plasma: 15 - 45 mg/dl** (2,5 - 7,51 mmol/l)
- **Urina pe 24 ore: 20 - 36 g** (330 - 600 mmol).

**Creatinina în ser (plasmă):**

- **Femei: < 0,9 mg/dl**
- **Bărbaţi: < 1,2 mg/dl**
- **Copii: < 0,7 mg/dl**

**Creatinina in urină:**

- **1 - 1,8 g/24 ore** (8,84 – 16 mmol/24 ore).

**Clearance-ului creatininei endogene:**

- **$Cl_{cr}$ = 95 - 125 ml/min.**
- **Clearance-ul creatininei scade, în nefropatiile acute şi cronice, înainte de creşterea creatininei serice!!**
- De aceea se calculează **raportul Uree serică / Creatinina serică = 20-30**

# Valori de referinta pentru raportul uree/creatinina = 10 - 20

| Creşterea raportului uree/creatinina (> 20) cu niveluri normale de creatinina (azotemie prerenală) | Creşterea raportului ureecreatinina (> 20) cu niveluri crescute de creatinina (azotemie postrenală) |
|---|---|
| – insuficienţa cardiacă, depleţie de sare, deshidratare,<br>– hemoragie digestivă; stări de hipercatabolism;<br>– afectarea funcţiei renale asociată cu ingestie/producţie excesivă de proteine sau distrucţie tisulară. | – obstrucţii ale tractului urinar. |

| Scăderea raportului uree/creatinina (< 10) cu niveluri scăzute de uree | Scăderea raportului BUN/creatinina (< 10) cu niveluri crescute de creatinina |
|---|---|
| – necroza tubulară acută;<br>– reducerea sintezei de uree în afecţiuni hepatice severe sau înfometare;<br>– dialize repetate;<br>– sindromul secreţiei inadecvate de ADH;<br>– sarcina. | – rabdomioliza (se eliberează creatinina musculară);<br>– afecţiuni musculare care asociază insuficienţa renală. |