

## Aspetti pre-analitici ed analitici della determinazione automatizzata del lattato del plasma

Cristina Valente<sup>1</sup>, Irene Moraschinelli<sup>2</sup>, Mauro Panteghini<sup>1,3</sup>, Carlo Franzini<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Azienda Ospedaliera Luigi Sacco, Milano

<sup>2</sup>Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico, Università degli Studi dell'Insubria, Varese

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze Cliniche "Luigi Sacco", Università degli Studi di Milano, Milano

### ABSTRACT

#### Pre analytical and analytical aspects of automated measurement of plasma lactate

Some aspects of the automated measurement of lactate in undeproteinized plasma, with a method based on lactate oxidation (lactate oxidase) coupled to colorimetric measurement of hydrogen peroxide, are evaluated. In particular, lactate stabilization by glycostatic agents (monoiodoacetate and fluoride), and their possible interference on the enzymatic method, have been evaluated. Both agents performed satisfactorily, even if fluoride exhibited slightly better performance, and is therefore recommended. The whole analytical system (including the pre-analytical and the analytical phases) allows reliable plasma lactate measurements. Non parametric reference values for the system (including a mean overestimation of about 0.20 mmol/L due to glycolysis occurring during 1-3 hour storage at room temperature) are estimated to be in the interval from 0.62 to 2.35 mmol/L.

### RIASSUNTO

Sono valutati alcuni aspetti della determinazione automatizzata del lattato del plasma non deproteinizzato, con metodo enzimatico basato sulla ossidazione del lattato (lattato ossidasi) e determinazione colorimetrica del perossido d'idrogeno originato. Particolare attenzione è rivolta all'effetto stabilizzante sulla concentrazione del lattato da parte di agenti glicostatici (monoiodoacetato e fluoruro), ed alla valutazione della loro possibile interferenza sul metodo enzimatico. Entrambi gli agenti glicostatici consentono prestazioni accettabili, lievemente superiori per il fluoruro che è pertanto raccomandato. Il sistema analitico (insieme di fase pre-analitica - campione raccolto con fluoruro ed analitica - metodo enzimatico colorimetrico) consente determinazioni attendibili e stabili nel tempo del lattato del plasma. I relativi valori di riferimento (ottenuti con statistica non parametrica), inclusivi di una sovrastima media di circa 0,20 mmol/L dovuta alla glicolisi che avviene nello spazio di 1-3 ore dal prelievo per conservazione a temperatura ambiente del campione prima della misurazione, sono stimati essere compresi tra 0,62 e 2,35 mmol/L.

### INTRODUZIONE

La concentrazione del lattato nel sangue è mantenuta ad un livello relativamente costante, corrispondente ad una variabilità biologica intraindividuale media del 27,2% (1), dal complesso bilanciamento delle attività di differenti organi che lo producono (prevalentemente muscolo, cervello, pelle, eritrociti, intestino) o che lo consumano (prevalentemente fegato, cuore e rene) (2).

La misurazione del lattato del plasma trova applicazione medica prevalentemente nel controllo dell'esercizio fisico (3), nel controllo dei pazienti in unità di terapia intensiva (2,4,5), e nella valutazione iniziale e nella sorveglianza delle disfunzioni mitocondriali che provocano inadeguatezza della catena respiratoria e dalla fosforilazione ossidativa (6). In quest'ultimo capitolo rientrano sia una serie di lesioni mitocondriali ereditarie associate a difetti del DNA mitocondriale, che si manifestano con differenti sindromi cliniche (6,7), sia difetti conseguenti a terapie antivirali altamente attive (Highly Active Antiretroviral Therapy, HAART) impiegate nella infezione da virus della immunodeficienza umana (HIV) (6, 8-10). Di conseguen-

za, il numero di determinazioni di lattato richieste ad un Laboratorio Clinico può essere discretamente elevato (oltre 200/mese nella nostra esperienza), il che implica il ricorso a metodi di analisi automatizzata che tuttavia garantiscano elevata precisione ed accettabile stabilità del campione biologico nel tempo.

In questo lavoro abbiamo riconsiderato alcuni aspetti pre-analitici ed analitici di un sistema adatto per la misura del lattato del plasma in condizioni ordinarie (cosiddette "di routine"), basato su un metodo automatizzato con l'impiego di reagenti commerciali.

### MATERIALI E METODI

I campioni di sangue erano ottenuti mediante prelievo venoso, con stasi minima, utilizzando un sistema di prelievo sotto vuoto (Vacutainer System, Becton Dickinson Italia SpA, Milano), impiegando, secondo le necessità, le seguenti provette: 1) provette da 4 mL, contenenti 96 U di litio eparina; 2) provette da 2 mL contenenti fluoruro di sodio (5 mg, concentrazione finale nel campione: 2,5

mg/mL) e ossalato di potassio (4 mg); 3) provette da 3 mL contenenti monoiodoacetato di litio (1,5 mg, concentrazione finale nel campione: 0,5 mg/mL) e litio eparina (60 UI). Se non altrimenti specificato, i campioni per analisi in condizioni ordinarie erano raccolti con fluoruro/ossalato, trasportati e conservati a temperatura ambiente, centrifugati entro 3 ore a 10 °C; il plasma era quindi analizzato entro ulteriori 60 minuti.

Per la verifica della stabilità a temperatura ambiente erano utilizzati campioni di sangue appositamente ottenuti da volontari e raccolti nei differenti tipi di provette. Immediatamente, ed ai successivi tempi previsti, i campioni erano centrifugati, la minima quantità di plasma necessaria per l'analisi era prelevata, e quindi il campione residuo era mescolato e conservato (a temperatura ambiente) fino al momento della successiva centrifugazione/prelievo di aliquota di plasma.

Per la verifica della possibile interferenza analitica dei glicostatici sulle misurazioni di glucosio e di lattato si usavano i materiali di controllo (liofilizzati) commerciali, Precinorm (PN) e Precipath (PP) (Roche Diagnostics, Mannheim). A provette contenenti fluoruro/ossalato o monoiodoacetato/eparina erano aggiunti volumi di entrambi i materiali di controllo (ricostituiti) pari al volume di aspirazione previsto dalla provette (rispettivamente, 2 e 3 mL), nonché pari alla metà e ad un quarto di tali volumi, ottenendo in tal modo campioni di siero arricchiti dei due glicostatici a concentrazioni pari ai valori usuali ed ai rispettivi valori doppi e quadrupli.

Per la misurazione delle concentrazioni di glucosio e di lattato nel plasma (non deproteinizzato) si sono utilizzati due metodi simili, basati su due reazioni enzimatiche accoppiate. Nella prima (reazione primaria), specifiche substrato ossidasi (rispettivamente glucosio ossidasi e L-lattato ossidasi), ossidano il rispettivo substrato in presenza di ossigeno molecolare, con formazione di perossido d'idrogeno in quantità stechiometrica. Nella seconda (reazione indicatrice, comune ai due metodi) l'enzima perossidasi catalizza l'ossidazione da parte del perossido

d'idrogeno di un sistema accettore di tipo "Trinder" (4-aminoantipirina + donatore di protoni) con formazione di acqua e di una addotto cromogenico, che viene misurato fotometricamente. Per entrambe le misurazioni si sono utilizzati reagenti commerciali, calibratori, controlli ed un analizzatore automatizzato (Modular) forniti da Roche Diagnostics. Tutte le concentrazioni sono state espresse in mmol/L.

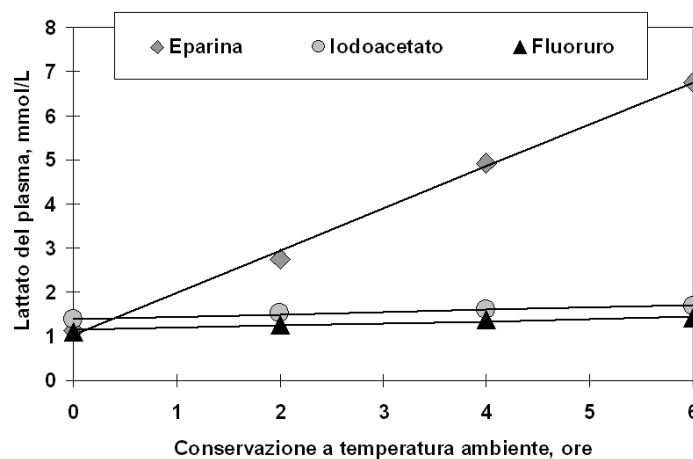
Per la valutazione delle distribuzioni di frequenza dei valori di lattato misurati, sono stati recuperati dal sistema informativo del laboratorio tutti i valori ottenuti in condizioni ordinarie nel periodo Ottobre 2003 - Settembre 2005 (n = 3701), con un numero di valori mensili oscillante tra 99 e 207. Per i valori  $\leq 2,5$  mmol/L, osservati nell'intero periodo ed in ciascuno dei 24 mesi, sono anche stati determinati i valori corrispondenti al 2,5°, 50° e 97,5° percentile (non parametrico) delle distribuzioni.

I calcoli statistici (medie, DS, regressione lineare) sono stati effettuati con i programmi MS Excel e Method Validator. I valori di pendenza delle rette di regressione lineare sono stati considerati significativamente diversi da 0 (zero), e quindi indicativi di significativa variazione, se 0 non era compreso all'interno del rispettivo intervallo di confidenza al 95%.

## RISULTATI

I valori di imprecisione analitica entro-la-serie e globali, come CV % a due livelli di concentrazione (1,99 mmol/L e 3,00 mmol/L), sono risultati compresi tra 1,12 % e 1,43 %.

La figura 1 mostra il marcato aumento del lattato nel plasma di sangue trattato con sola eparina e conservato a temperatura ambiente; al contrario, monoiodoacetato e fluoruro esercitano una marcata azione stabilizzante sui due metaboliti. La tabella 1 mostra che l'aumento del lattato si accompagna ad una corrispondente diminuzione del glucosio, per cui la somma dei due metaboliti [calcolata come (glucosio + 1/2 lattato), poiché da una molecola di glucosio si generano 2 molecole di lattato] appare sostan-



**Figura 1**

Variazioni nel tempo del lattato del plasma in campioni di sangue conservati a temperatura ambiente, prelevati senza glicostatico (rombi) oppure in presenza di monoiodoacetato (tondi) o di fluoruro (triangoli)

**Tabella 1**

Concentrazioni plasmatiche di glucosio, di lattato e della somma [glucosio + 1/2 lattato] misurate in campioni di sangue conservati a temperatura ambiente, trattati con eparina (HEP), con monoiodoacetato + eparina (IOD) e con fluoruro + ossalato (FLU). Valori medi  $\pm$ D.S. dalla analisi di 6 campioni

Tempo, ore	Glucosio, mmol/L			Lattato, mmol/L			Somma, mmol/L		
	HEP	IOD	FLU	HEP	IOD	FLU	HEP	IOD	FLU
0	5,21 $\pm$ 0,38	5,27 $\pm$ 0,43	5,29 $\pm$ 0,38	1,13 $\pm$ 0,47	1,38 $\pm$ 0,42	1,11 $\pm$ 0,50	5,77 $\pm$ 0,47	5,96 $\pm$ 0,50	5,84 $\pm$ 0,49
2	4,61 $\pm$ 0,43	4,87 $\pm$ 0,39	5,04 $\pm$ 0,31	2,75 $\pm$ 0,70	1,52 $\pm$ 0,42	1,26 $\pm$ 0,56	5,96 $\pm$ 0,52	5,6 $\pm$ 30,47	5,57 $\pm$ 0,49
4	3,58 $\pm$ 0,43	4,73 $\pm$ 0,34	4,93 $\pm$ 0,31	4,93 $\pm$ 1,08	1,61 $\pm$ 0,43	1,38 $\pm$ 0,60	6,04 $\pm$ 0,61	5,54 $\pm$ 0,42	5,62 $\pm$ 0,50
6	2,83 $\pm$ 0,51	4,80 $\pm$ 0,37	4,99 $\pm$ 0,31	6,76 $\pm$ 1,42	1,68 $\pm$ 0,44	1,41 $\pm$ 0,62	6,21 $\pm$ 0,71	5,56 $\pm$ 0,47	5,70 $\pm$ 0,52
Pendenza(1)	-0,41	-0,08 (ns)	-0,05 (ns)	0,95	0,05	0,05	0,07	-0,006 (ns)	-0,02 (ns)
R(2)	0,995	0,827	0,825	0,999	0,987	0,966	0,989	0,821	0,405

(1) Pendenza della retta di regressione lineare dei valori di concentrazione misurati (in mmol/L)/tempo di conservazione (ore). (2) Coefficiente di correlazione dei valori di concentrazione sul tempo. ns: non significativamente differente da zero

zialmente stabile sia in presenza che in assenza dei glicostatici. In particolare, in presenza di monoiodoacetato e di fluoruro (colonne "IOD" e "FLU" della tabella 1) il lattato, dopo un moderato aumento nelle prime 2 ore (0,15 mmol/L contro 1,62 mmol/L in assenza di glicostatico), risulta abbastanza stabile (ulteriori aumenti di circa 0,1 mmol/L ogni ulteriori 2 ore); il glucosio e la somma mostrano variazioni corrispondenti.

La verifica di interferenza analitica da parte dei due glicostatici, aggiunti in concentrazione fino a 4 volte quella usuale, è rappresentata nella figura 2, dove in ascisse sono riportate le concentrazioni di glicostatico, come multipli della concentrazione usuale. Le pendenze delle rette di regressione sono risultate non significativamente differenti da 0, e comprese tra 0,00 e 0,04 per il fluoruro e tra 0,01 e 0,07 per il monoiodoacetato, quest'ultimo con valori (0,07) al limite della significatività statistica.

La figura 3 mostra la distribuzione di frequenza dei 3701 valori di lattato nel plasma misurati nel corso di 2 anni: non sono riportati 4 valori >10,0 mmol/L riscontrati nel medesimo periodo. I 3343 valori  $\leq$ 2,50 mmol/L mostravano una media di 1,35 mmol/L; con DS = 0,46 mmol/L. Nell'inserito di figura 3 la distribuzione dei valori misurati di lattato è confrontata con la distribuzione normale (gaussiana) teorica di una popolazione di valori con tale media e DS. E' evidente la asimmetria della distribuzione osservata, che mostra anche un'irregolarità tra 2,1 e 2,3 mmol/L.

Nella figura 4 sono riportati i valori corrispondenti ai percentili non parametrici dei valori  $\leq$ 2,5 mmol/L osservati mensilmente per 24 mesi consecutivi, in confronto con i medesimi percentili della popolazione totale dei valori osservati nell'arco di due anni. Si osserva la costanza dei valori mediani mensili e la loro corrispondenza con la mediana dell'intero periodo.

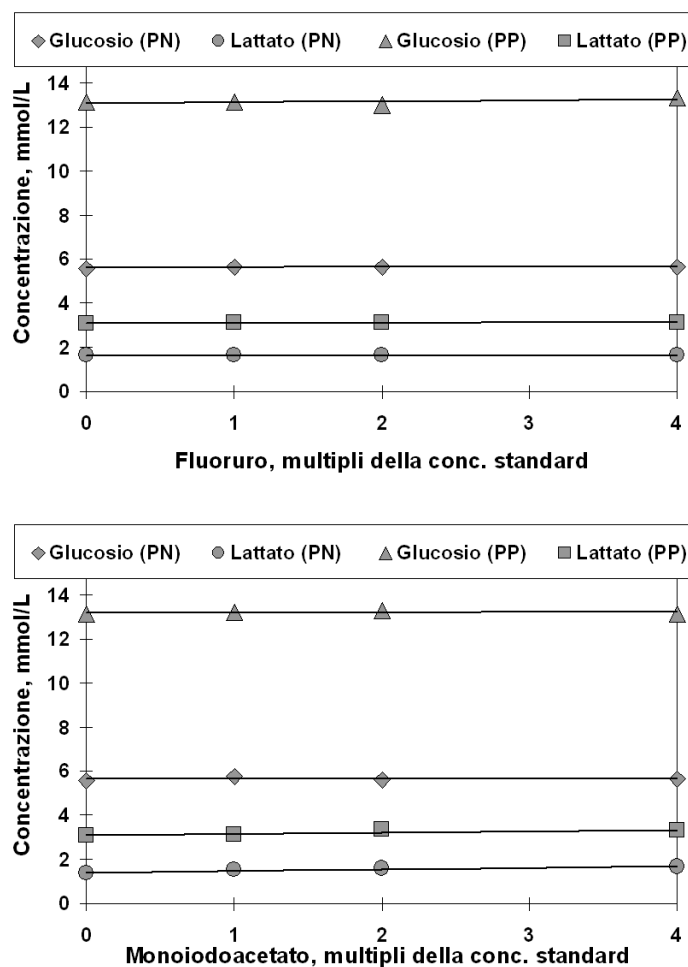
## DISCUSSIONE

Il lattato del plasma, deproteinizzato o meno, può essere determinato con una reazione enzimatica basata sulla conversione del lattato in piruvato per opera della

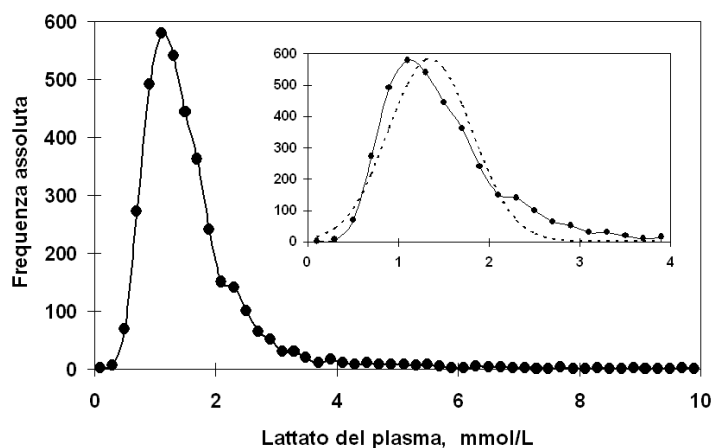
lattato deidrogenasi, misurando spettrofotometricamente la contemporanea riduzione di NAD<sup>+</sup> a NADH (11) e spostando l'equilibrio della reazione mediante allontanamento del piruvato, convertendolo nel suo idrazone od aggiungendo alla reazione glutammato ed alanina amminotransferasi. L'applicazione di tale principio analitico ad analizzatori automatici, con (12) o senza preliminare deproteinizzazione del sangue intero, presentava tuttavia alcuni problemi, come discusso da Artiss et al. (13). Più recentemente sono stati proposti metodi basati sulla reazione catalizzata dalla lattato ossidasi seguita da determinazione colorimetrica del perossido d'idrogeno con reazione di tipo Trinder (14), come quello qui utilizzato, facilmente e più vantaggiosamente applicabili ad analizzatori automatici (13,15).

L'imprecisione analitica osservata con tale metodo (< 1,5 %) è assai inferiore al traguardo analitico per tale analisi (13,6 %) calcolato sulla base della variabilità biologica (1).

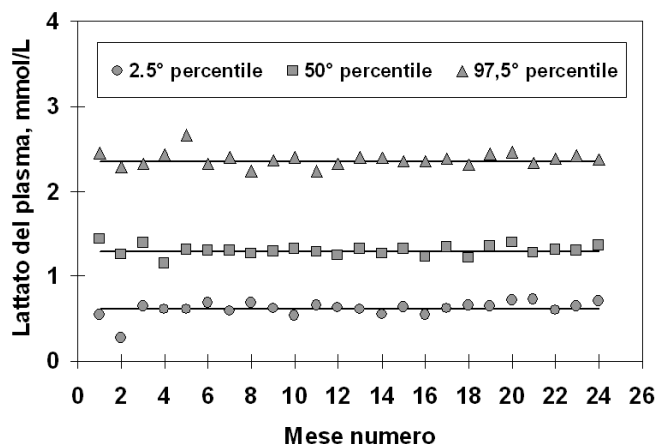
*In vitro* il glucosio nel sangue tende a diminuire per effetto della glicolisi anaerobica, per opera degli enzimi contenuti nelle cellule, con contemporaneo aumento del lattato. L'immediata deproteinizzazione e/o la conservazione del campione in ghiaccio bloccano o minimizzano tali effetti, ma sono entrambi di scarsa praticabilità. La possibile alternativa è trattare immediatamente il campione con agenti glicostatici, tra cui principalmente il monoiodoacetato ed il fluoruro (16,17). Quest'ultimo tuttavia non avrebbe sostanziale effetto stabilizzante nella prima ora di conservazione, mentre nei periodi successivi rallenterebbe fortemente, senza tuttavia azzerarla, la caduta della concentrazione di glucosio (16). Nei nostri esperimenti non era tuttavia incluso il controllo ad un'ora. Nelle prime due ore di conservazione le variazioni medie di concentrazione di glucosio e di lattato (in mmol/L) risultavano, rispettivamente -0,60 e +1,62 in assenza di glicostatico; -0,4 mmol/L e +0,14 in presenza di iodoacetato; -0,25 e + 0,14 in presenza di fluoruro. Nei tempi successivi le ulteriori variazioni di lattato, marcate in assenza di glicostatico (vedi anche figura 1), erano comprese tra +0,10 e +0,05 mmol/L per ora in presenza dei due glicostatici.



**Figura 2**  
 Concentrazioni di glucosio e di lattato misurate in due sieri di controllo (PN e PP) in assenza ed in presenza di monoiodoacetato e di fluoruro, in concentrazioni crescenti. Le concentrazioni dei glicostatici (asse delle ascisse) sono riportate come multipli di quelle presenti in condizioni ordinarie



**Figura 3**  
 Distribuzione di frequenza di 3701 valori di lattato misurati in condizioni ordinarie nell'arco di 2 anni. 4 valori > 10,0 mmol/L non sono riportati. Nell'insero la linea tratteggiata mostra la distribuzione gaussiana teorica di una popolazione con media = 1,35 mmol/L e DS = 0,46 mmol/L



**Figura 4**

Parametri delle distribuzione di frequenza (2,5°, 50° e 97,5° percentile non-parametrico) dei valori <2,5 mmol/L osservati mensilmente in 24 mesi consecutivi. Le numerosità mensili erano comprese tra 85 e 189. Le linee orizzontali indicano i corrispondenti percentili della distribuzione dei valori totali <2,5 mmol/L (n = 3343)

Questi dati confermano sostanzialmente i dati riportati in letteratura per il fluoruro (16), evidenziando un effetto stabilizzante anche nelle prime 2 ore, leggermente più marcato per il fluoruro, in presenza del quale si misurano sempre valori di lattato leggermente più bassi che in presenza di iodoacetato. Recentemente, è stata proposta una miscela glicostatica (gliceraldeide/fluoruro/ossalato) capace di meglio stabilizzare la concentrazione di glucosio, e quindi verosimilmente di lattato, del sangue prelevato (17). Non sono tuttavia disponibili provette per prelievo sotto vuoto contenenti tale miscela, che quindi non è stata sperimentata, né è stata effettivamente controllata la efficacia della medesima nello stabilizzare anche il lattato. Se il lattato è misurato su sangue intero, in apparecchi per emogasanalisi, il sangue eparinato può essere conservato fino a 4 ore tenendo le provette in ghiaccio (18).

Le verifiche di possibile interferenza da parte dei due glicostatici, in concentrazioni fino a 4 volte le ordinarie, non hanno evidenziato sostanziale interferenza da parte del fluoruro ma hanno dimostrato una leggera interferenza positiva nella determinazione del lattato da parte del moniodoacetato (pendenze delle rette di regressione pari a 0,07, ai limiti della significatività). Per le ragioni su esposte, la miscela fluoruro/ossalato è stata adottata per prelievi di sangue per analisi ordinarie.

La distribuzione di frequenza dei valori mensili di lattato, ottenuti nelle condizioni ordinarie, senza un controllo accurato del tempo di trasporto/conservazione (dal prelievo alla centrifugazione, tempo stimato tra 1 e 3 ore) mostra come le condizioni ordinarie adottate (fase pre-analitica ed analitica) consentano un'accettabile riproducibilità nel tempo dei valori ottenuti.

Il limite superiore di riferimento (LSR) è importante perché rappresenta la soglia per le classificazioni cliniche dei pazienti (vedi per es. rif. 10), ed è, per lo più, fissato attorno a 2,00-2,25 mmol/L (10-12). Considerando che l'irregolarità della curva di frequenza dei valori di lattato misurati, evidente a livello dei valori 2,1-2,3 mmol/L (figura

3), può indicare la sovrapposizione di valori patologici alla distribuzione dei fisiologici, abbiamo effettuato alcune considerazioni eliminando i valori >2,5 mmol/L. I rimanenti valori (considerati "normali" (3342 valori, pari al 90 % del totale) mostrano una media pari a 1,35 mmol/L e DS=0,46 mmol/L, con un intervallo centrale del 95 % dei valori (media  $\pm 2DS$ ) compreso tra 0,44 mmol/L e 2,26 mmol/L, corrispondente quasi esattamente a quanto riportato da altri (10) (da 0,5 mmol/L a 2,25 mmol/L). Considerata tuttavia la non-normalità della distribuzione nell'intervallo considerato (vedi inserto della figura 3), appare più corretto assumere come intervallo di riferimento l'intervallo centrale non-parametrico 95 %, che è risultato compreso tra 0,62 mmol/L e 2,35 mmol/L (mediana: 1,29 mmol/L). Tale intervallo è verosimilmente comprensivo del possibile incremento del lattato (mediamente di circa 0,2 mmol/L) dovuto alla glicolisi che avviene nello spazio di 1-3 ore dal prelievo alla misurazione.

In conclusione, le condizioni pre-analitiche ed analitiche qui raccomandate, consentono una misurazione attendibile e riproducibile nel tempo della concentrazione di lattato del plasma, adattabile all'elevato numero di richieste di questo esame che normalmente sono inviate ad un Laboratorio ospedaliero.

## BIBLIOGRAFIA

1. Panteghini M, Pagani F. Biological variation of lactate and pyruvate in blood [Letter]. *Clin Chem* 1993;39:908.
2. Holloway P, Benham S, St. John A. The value of blood lactate measurement in ICU: an evaluation of the role in the management of patients on haemofiltration. *Clin Chim Acta* 2001;307:9-13.
3. Roi GS, Bianchini A, Cerizza C. Modificazioni della lattacidemia durante esercizio. *Ligand Assay* 1999;4:128-31.
4. Shapiro NI, Howell MD, Talmor D, Nathanson LA, Lisbon A, et al. Serum lactate as a predictor of mortality in emergency department patients with infection. *Ann Emerg Med* 2005;45:524-8.

5. Gaiesky DF, Goyal M. Serum lactate as a predictor of mortality in emergency department patients with infection: does the lactate levels tell us the whole story ? [Letter]. *Ann Emerg Med* 2005;46:561-2.
6. Hancock MR. Mitochondrial dysfunction and the role of the non-specialist laboratory [Review]. *Ann Clin Biochem* 2002;39:456-63.
7. Bauer MF, Gempel K, Hofman S, Jaksch M, Philbrook C, et al. Mitochondrial Disorders. A diagnostic challenge in clinical chemistry [Review]. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:855-76.
8. Blanche S, Tardieu M, Rustin P, Slama A, Barret B, et al. Persistent mitochondrial dysfunction and perinatal exposure to antiretroviral nucleoside analogues. *Lancet* 1999;354:1084-9.
9. Brinkman K, Smeiting JA, Romijn JA, Reiss P. Mitochondrial toxicity induced by nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitors is a key factor in the pathogenesis of antiretroviral-therapy-related lipodystrophy. *Lancet* 1999;354:1112-5.
10. Marceau G, Sapin V, Jacomet C, Ughetto S, Cormerais L, et al. Frequency, risk factors, and outcome of hyperlactatemia in HIV-positive persons: implications for the management of treated patients. *Clin Chem* 2003;49:1154-62.
11. Noli F. L-(+)-lactate. In: Bergmeyer HU Ed., 3<sup>o</sup> edition. *Methods of enzymatic analysis, Vol VI. Metabolites 1: Carbohydrates*. Weinheim, GE: Verlag Chemie 1984: 582.
12. Bonora M, Panteghini M. An enzymatic method for lactate in whole blood adapted to the Cobas Bio. *Clin Chem* 1989;35:324-5.
13. Artiss JD, Karcher RF, Cavanagh KT, Collins SL, Petersen VJ, et al. A liquid-stable reagent for lactic acid levels. *Am J Clin Pathol* 2000;114:139-43.
14. Bozimowski D, Artiss JD, Zak B. Sensitive determination of cerebrospinal fluid pyruvate, lactate and glucose concentrations. *Clin Chim Acta* 1985;153:63-9.
15. Dorn AR, Hunt CJ, Mountain LD. Evaluation of a liquid lactate reagent for use on the BM/Hitachi series analyzers [Abstract]. *Clin Chem* 1998;44:A115.
16. Chan AYW, Swaminathan R, Cocram CS. Effectiveness of sodium fluoride as a preservative of glucose in blood. *Clin Chem* 1986;35:315-7.
17. Le Roux CW, Wilkinson SD, Pavitt DV, Muller BR, Alaghband-Zadeh J. A new antiglycolytic agent. *Ann Clin Biochem* 2004;41:43.6.
18. Andersen O, Haugaard SB, Jorgensen LT, Sorensen S, Nielsen JO, et al. Preanalytical handling of samples for measurement of plasma lactate in HIV patients. *Scand J Clin Lab Invest* 2003;63:449-54.