



QUIMIDHL - Lactato Desidrogenase

Piruvato > Lactato

REG. MS: 10159820162

RESPONSÁVEL TÉCNICA

Dra. Nadjara Novaes Longen | CRF-SP - 37.451

Para mais informações, entrar em contato com o **SAC EBRAM**

0800 500 2424 ou 11 2574 7110

sac@ebram.com | www.ebram.com

FINALIDADE. Reação enzimática para determinação quantitativa de lactato desidrogenase em amostras de soro e plasma humanos. Somente para uso diagnóstico "in vitro".

PRINCÍPIO. A enzima lactato desidrogenase (LDH) catalisa a redução do piruvato por NADH, obtendo-se lactato e NAD⁺. A concentração catalítica determina-se a partir da velocidade de desaparecimento do NADH, medido a 340nm.



METODOLOGIA.

SIGNIFICADO CLÍNICO. Valores elevados são encontrados em neoplasias em geral, megaloblásticas, mononucleose infecciosa e miopatias. No infarto do miocárdio, aumentos são notados cerca de 12 horas após o infarto e usualmente se normalizam após a TGO. Aumentos são observados também no infarto pulmonar. Outras causas de aumento são: hepatite, alcoolismo, infarto renal, pancreatite aguda, destruição excessiva de células, fraturas, obstrução intestinal. Na mononucleose com comprometimento hepático aumenta mais do que a TGO. Nas hepatites A,B ou C, ao contrário, a TGO aumenta muito mais do que a LDH.

REAGENTES.

Reagente 1: Pronto para uso. Conservar entre 2 - 8 °C. Contém: Tris 100mmol/L, piruvato 2,75 mmol/L, cloreto de sódio 222 mmol/L

Reagente 2: Pronto para uso. Conservar entre 2 - 8 °C. Contém: NADH 1,55mmol/L, azida de sódio 9,5 g/L.

Os reagentes não abertos são estáveis até a data de vencimento impressa no rótulo do produto, e e on board (em um compartimento refrigerado do analisador) possuem estabilidade de aproximadamente 30 dias. Durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos a contaminação de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

REAGENTE DE TRABALHO

Para alguns analisadores é necessário preparar o Reagente de Trabalho (verifique o protocolo do analisador): Preparar 4 partes do reagente 1 para 1 parte do reagente 2. Ex: 4mL de R1 + 1mL de R2. O reagente após o preparo é estável por até 60 dias quando armazenado entre 2 - 8°C ao abrigo da luz.

PRECAUÇÕES E CUIDADOS REQUERIDOS. Este reagente deve ser usado somente para diagnóstico "in vitro". Não pipetar com a boca. Evitar contato com a pele e roupa. No caso de contato com os olhos, lavar com grande quantidade de água e procurar auxílio médico.

Deve-se monitorar a temperatura do ambiente de trabalho bem como o tempo de reação para obtenção de resultados corretos. Separar o soro ou plasma logo após a colheita.

Não usar se a absorbância do branco ultrapassar 1,2 quando medido em 340 nm (cuveta de 1cm), se o reagente estiver turvo ou se houver dificuldade em conseguir os valores estabelecidos para o soro controle fresco.

MATERIAL NECESSÁRIO NÃO FORNECIDO.

1. Banho-maria ou analisador capaz de manter uma temperatura de 37°C e capaz de medir absorbância de 340 nm.
2. Pipetas para medição de amostras e reagente.
3. Consumíveis do analisador quando usado.
4. Soros Controle e Calibrador
5. Cronômetro

AMOSTRA. Soro livre de hemólise ou plasma heparinizado são recomendados. O soro deve ser separado do coágulo rapidamente. O LDH no soro é estável por 2 dias a temperatura ambiente ou 24horas a 2-8°C. Não congelar ou expor o soro à altas temperaturas (37°C), pois pode inativar as isoenzimas termolábeis da LDH.

Todas as amostras são consideradas potencialmente infectantes, portanto sugerimos manuseá-las seguindo as normas estabelecidas de Biossegurança.

PREPARO DO PACIENTE. É recomendado um jejum de 4 horas. Todavia, poderá ser modificado segundo orientação médica.

INTERFERÊNCIAS.

Amostras hemolisadas ou amostras que foram separadas tarde, ocasionam resultados elevados devido a grande concentração de LDH nos eritrócitos. Bilirrubina até 20 mg/dL e Triglicérides até 10g/L não interferem significativamente no resultado. Algumas drogas e substâncias afetam concentração da LDH, sugerimos consultar Young et al.

PARÂMETROS DO SISTEMA:

Temperatura	37°C
Comprimento de Onda	340nm
Tipo de Reação	Cinética
Direção	Decrescente
Relação Amostra/Reativo	1:40
Vol. Amostra	25 µL
Vol. Reagente	1,0 mL (800µL R1 + 200µL R2)
Tempo de Incubação	30 segundos (retardo)
Intervalo de leitura	1 minuto
Número de Intervalos	2 - 3

CALIBRAÇÃO. Utilizar Quimicalib Ebram cód.7023/12023 que possui a concentração rastreável ao método de referência de correlação com o método comercial, ou realizar a calibração através de fatoração, obtida através da absorção média milimolar do NADH a 340 nm (6.30) sob condições específicas.

PROCEDIMENTO AUTOMATIZADO. Aplicação no sistema automatizado: vide manual para utilização do equipamento e instruções de uso do reagente.

Aplicação no sistema semi-automático: proceder como demonstrado a seguir no procedimento manual somente até o item 2 (preparação dos tubos), em seguida utilizar o equipamento para leitura, seguindo protocolo analítico específico baseado no item Parâmetros do Sistema.

Nota: Adicionar as amostras no tubo somente no momento que antecede a aspiração do equipamento.

PROCEDIMENTO MANUAL.

1. Preparar o Reagente de Trabalho: Misturar os reagentes na proporção: 1 parte do Reagente 2 + 4 partes do Reagente 1 (4mL R1 + 1mL R2).

2. Separar 3 tubos de ensaio e realizar os procedimentos conforme abaixo:

Tubos	Branco	Padrão	Amostra/S.C.
Água destilada	25µL	-	-
Calibrador	-	25µL	-
Amostra S/C	-	-	25µL
Reagente	1,0mL	1,0mL	1,0mL

3. Adicionar 1,0 mL do reagente de trabalho em dois tubos e deixar em banho maria (BM) a 37°C O nível de água no BM deve ser superior ao nível de reagentes nos tubos de ensaio.
4. Adicionar 25µL do calibrador e 25µL de água destilada em cada tubo.
5. Aguardar 30 segundos
6. Zerar o espectrofotômetro a 340nm com o tubo do branco.
7. Inserir no equipamento o tubo com o calibrador e registrar as absorbâncias A1, A2, A3, considerando A1 a primeira leitura (logo após os 30 segundos de retardo) e as seguintes com 1 minuto de intervalo.

- Determinar as duas diferenças de absorbância/min (Δ Abs/min), subtraindo cada leitura da sua anterior.
- Determinar a média das diferenças de absorbância (Δ Abs/min). Proceder em seguida do mesmo modo com os controles e todas as amostras.

Obs.: Procedimento sugerido para espectrofotômetros que requerem volume mínimo de 1,0 mL e podem ser ajustados proporcionalmente sem influência no desempenho do teste. Salientamos que volumes de amostra menores do que 10 μ L aumentam a imprecisão da medição em aplicações manuais.

CÁLCULOS.

(Abs. = Absorbância)

(Conc. = Concentração)

$$\Delta \text{Abs. /min} = (\text{A2} - \text{A1}) + (\text{A3} \text{ A2}) / 2$$

LDH da amostra (U/L) =

$$\frac{\Delta \text{Abs. /min (amostra)}}{\Delta \text{Abs. /min (Calib)}} \times \text{Conc. do Calib (U/L)}$$

EXEMPLO.

Absorbância com o Calibrador

$$\text{A1} = 0,008 / \text{A2} = 0,023 / \text{A3} = 0,038$$

$$\text{Média } \Delta \text{Abs./min} = \frac{(\text{A0,023} - \text{A0,008}) + (\text{A0,038} - \text{A0,023})}{2}$$

$$\text{Média } \Delta \text{Abs./min (calib)} = 0,015$$

$$\text{Média } \Delta \text{Abs./min (amostra)} = 0,017 \text{ (calc. I dem acima)}$$

$$\text{Concentração do Calibrador} = 383 \text{ U/L}$$

$$\text{LDH Amostra} = (0,017 / 0,015) 383$$

$$\text{LDH Amostra} = 434 \text{ U/L}$$

$$\text{Obs: nkat/L} = \text{U/L} \times 16,67$$

LINEARIDADE. Quando executado de acordo com o recomendado, o teste é linear até 1250 U/L. Amostras com valores superiores a 1250 U/L devem ser diluídas com solução salina a ponto de ficarem entre 4.7 - 1250 U/L e os resultados devem ser multiplicados pelo fator de diluição.

CONTROLE DE QUALIDADE. Cada laboratório deve manter um programa interno de qualidade que defina objetivos, procedimentos, normas, limites de tolerância e ações corretivas. Deve-se manter também um sistema definido para se monitorar a variação analítica do sistema de medição. Aconselhamos o uso dos soros controle Quimicontrol Normal e Quimicontrol Anormal Ebram Cód. 7024/12024 e 7031/12031.

VALORES ESPERADOS.

Os seguintes valores são baseados nas medições desempenhadas a 37°C.

1 a 3 anos: 490-730 U/L

4 a 9 anos: 320 - 520 U/L

10 a 13 anos: 250 a 500 U/L

Adultos: 200 - 480 U/L

Estes valores são dados unicamente como título orientativo. É recomendado que cada laboratório estabeleça seu próprio intervalo de referência.

ESTUDOS COMPARATIVOS. Estudos executados entre este procedimento e uma metodologia similar produziram os seguintes resultados:

Número de amostras	54
Intervalo dos resultados	5.0 - 634.0 (U/L)
Coeficiente de correlação	0.9987
Inclinação	1.0132
Intercepta	2.5(U/L)

PRECISÃO. Estudos de precisão foram executados com três níveis (baixo, normal e patológico) sendo que cada amostra fora processada por 10 vezes e os seguintes dados estatísticos foram encontrados:

N=40	Nível 1	Nível 2	Nível 3
Média (U/L)	126.2	391.0	715.3
D.P. (U/L)	1.5	3.1	3.4
C.V. (%)	1.9	0.8	0.5

EXATIDÃO. As amostras foram processadas por 10 dias consecutivos, uma vez por dia e em quadruplicata. Os seguintes dados estatísticos foram encontrados:

N=40	Nível 1	Nível 2	Nível 3
Média (mg/dL)	126.2	391.0	715.3
D.P. (mg/dL)	2.0	4.1	5.9
C.V. (%)	1.6	1.1	0.8

SENSIBILIDADE METODOLÓGICA. 4.7 U/L

ESPECIFICIDADE. Como as amostras foram selecionadas aleatoriamente em pacientes de ambulatório e hospitalizados, pode-se inferir que o método tem uma especificidade metodológica adequada.

OBSERVAÇÕES.

- A limpeza e a secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
- A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes e usar nas medições, deve ter resistividade ≥ 1 mega ohm ou condutividade ≤ 1 microsiemens e concentração de silicatos $< 0,1$ mg/L (água tipo II). Para o enxágüe da vidraria a água pode ser do tipo III, com resistividade $\geq 0,1$ megaohms ou condutividade ≤ 10 microsiemens. No enxágüe final utilizar água tipo II.

LIMITAÇÕES DO TESTE.

Como acontece com todos os testes de diagnóstico, todos os resultados devem ser avaliados juntamente com outras informações clínicas disponíveis para o médico.

APRESENTAÇÃO.

Linha Bioquímica Geral: R1= 8 x 10mL + R2= 4 x 5mL

Linha Bulk: R1= 1 x 200mL + R2= 1 x 50mL

Linha SAT: R1= 2 x 36mL + R2= 1 x 18mL

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.

- Buhl, S.N., et al, Clin. Chem. 23:1289(1977).
- Tietz, N.W., Fundamentals of Clinical Chemistry, 2nd Ed., Philadelphia, W.B. Saunders Co., p.657 (1976).
- Young, D.S. Effects of drug on clinical laboratory tests, 5th ed. AACC Press, 2000.
- Tietz Textbook of clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 4th ed. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. WB Saunders Co, 2005
- Arquivos da EBRAM.

SÍMBOLOS UNIVERSAIS UTILIZADOS EM EMBALAGENS DE DIAGNÓSTICO IN VITRO

	CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO		REAGENTE		FABRICADO POR
	O CONTEÚDO É SUFICIENTE PARA <N> TESTES		DATA DE VALIDADE (ÚLTIMO DIA DO MÊS)		NÚMERO DO LOTE
	LIMITE DE TEMPERATURA (CONSERVAR A)		PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO		NÚMERO DO CATÁLOGO