



LDH-P UNIM

AA

Método UV otimizado (SFBC) para a determinação de lactato desidrogenase (LDH) em soro ou plasma

SIGNIFICADO CLÍNICO

A determinação da atividade do lactato desidrogenase (LDH) tem uma grande variedade de aplicações clínicas. Visto que é uma enzima intracelular, sua elevação é indicio de dano tissular com a conseqüente liberação da enzima à circulação. O dano pode variar desde uma simples anoxia com ligeiro dano celular e perda de citoplasma até necrose celular severa gerando diversos graus de elevação da atividade enzimática.

No enfarte agudo do miocárdio, a atividade de LDH total (junto com a de CK e AST) constitui um elemento importante de diagnóstico. A atividade cardíaca começa a aumentar 12 a 24 horas após o enfarte, alcança um pico entre as 48-72 horas e permanece elevada até o sétimo ou décimo dia. Também se registra um aumento da atividade de LDH total em pacientes com necrose hepática (produzida por agentes tóxicos ou por infecções agudas como a hepatite viral) e também acompanhando necrose tubular renal, pielonefrite, etc. Nos tumores sanguíneo como leucemias e linfomas também são observados valores aumentados de LDH.

No líquido cefalorraquidiano (LCR) o valor normal é aproximadamente 10% do seu valor em soro, aumentado marcadamente seu valor em meningites bacterianas. Nas meningites virais a LDH aumenta seu valor só em 10% dos casos.

FUNDAMENTOS DO MÉTODO

Baseado no seguinte esquema de reação:



As concentrações do ensaio estão otimizadas de acordo com a Sociedade Francesa de Biologia Clínica (SFBC).

REAGENTES FORNECIDOS

A. Reagente A: frascos contendo NADH.

B. Reagente B: solução de tampão Tris pH 7,2 contendo piruvato e cloreto de sódio.

Concentrações finais (segundo SFBC)

Tris.....	80 mM; pH 7,2
piruvato.....	1,6 mmol/l
NADH.....	0,2 mmol/l
ClNa.....	200 mmol/l

INSTRUÇÕES PARA USO

Reagente A: adicionar o volume de Reagente B indicado no rótulo a um frasco de Reagente A. Tapar e agitar suavemente por inversão até dissolução completa. Datar.

Reagente B: pronto para uso.

PRECAUÇÕES

Os reagentes são para uso diagnóstico "in vitro".

Utilizar os reagentes observando as precauções habituais de trabalho no laboratório de análises clínicas.

Todos os reagentes e as amostras devem ser descartadas conforme à regulação local vigente.

ESTABILIDADE E INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Reagentes Fornecidos: são estáveis sob refrigeração (2-10°C) até a data de vencimento indicada na embalagem.

Reagente A reconstituído: é estável por 21 dias sob refrigeração (2-10°C) ou por 3 dias sob temperatura ambiente a partir do momento de sua reconstituição.

INDÍCIOS DE INSTABILIDADE OU DETERIORAÇÃO DOS REAGENTES

Quando o espectrofotômetro for levado a zero com água destilada, leituras de absorbância do Reagente A reconstituído abaixo de 0,800 D.O. ou acima de 1,800 D.O. (a 340 nm) são indícios de deterioração do mesmo.

AMOSTRA

Soro ou plasma

a) Coleta: deve-se obter soro do modo usual e separar do coágulo dentro de até duas horas após sua obtenção. Também pode-se utilizar plasma.

b) Aditivos: se for plasma, deve-se utilizar heparina como anticoagulante.

c) Substâncias interferentes conhecidas: as amostras com hemólise visível ou intensa podem produzir valores falsamente aumentados, por isso não devem ser utilizados. Referência bibliográfica de Young para efeitos de drogas neste método.

d) Estabilidade e instruções de armazenamento: a amostra deve ser preferencialmente fresca. A LDH é estável até 24 horas sob refrigeração. Não congelar.

MATERIAL NECESSÁRIO (não fornecido)

- Espectrofotômetro.
- Micropipetas e pipetas para medir os volumes indicados.
- Material volumétrico adequado.
- Banho-maria à temperatura indicada no procedimento.
- Cronômetro.

CONDIÇÕES DE REAÇÃO

(Diminuição de absorbância)

- Comprimento de onda: 340 nm (Hg 334 ou 366)

- Temperatura da reação: 25, 30 ou 37°C. Vide os VALORES DE REFERÊNCIA correspondentes a cada temperatura.
- Tempo de reação: 3 minutos e 30 segundos.
- Os volumes de amostra e reagente podem ser reduzidos proporcionalmente, sem que variem os fatores de cálculo.

PROCEDIMENTO

A) 25°C

Em uma cubeta mantida a temperatura de trabalho, colocar:

Reagente A reconstituído	3 ml
---------------------------------	------

Pré-incubar alguns minutos, e adicionar a seguir:

Amostra	100 ul
----------------	--------

Misturar imediatamente e disparar simultaneamente o cronômetro. Esperar 30 segundos. Ler a absorbância inicial (ver LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO) e após 1, 2 e 3 minutos da primeira leitura. Determinar a diferença média da absorbância/min ($\Delta A/\text{min}$), restando cada leitura da anterior e tirando a média dos valores. Utilizar esta média para os cálculos.

B) 30-37°C

I- MACROTÉCNICA

Utilizar 50 ul de Amostra, seguindo o procedimento indicado em A).

II- MICROTÉCNICA

Empregar 20 ul de Amostra e 1,0 ml de Reagente A reconstituído seguindo o procedimento indicado em A).

CÁLCULOS DOS RESULTADOS

$$\text{LDH (U/l)} = \Delta A/\text{min} \times \text{fator}$$

Em cada caso deverá ser utilizado o fator de cálculo correspondente de acordo com a temperatura de reação selecionada (30-37°C ou 25°C) e à técnica empregada (MICRO ou MACROTÉCNICA) como se indica na seguinte tabela de fatores:

Temp. L. onda	25°C	30-37°C	
		I	II
340 nm	4921	9683	8095
334 nm	5016	9871	8253
366 nm	9118	17941	15000

VALORES DE REFERÊNCIA

Temperatura	25°C	30°C (*)	37°C (*)
Valores (U/l)	120-240	160-320	230-460

(*) Calculados

Recomenda-se que cada laboratório estabeleça seus próprios valores de referência.

CONVERSÃO DE UNIDADES AO SISTEMA SI

$$\text{LDH (U/l)} \times 0,017 = \text{LDH (ukat/l)}$$

MÉTODO DE CONTROLE DE QUALIDADE

Processar 2 níveis de um material de controle de qualidade (**Standatrol S-E 2 níveis**) com atividades conhecidas de lactato desidrogenase, com cada determinação.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Ver Substâncias interferentes conhecidas em AMOSTRA.

- Absorbância inicial baixa: uma vez adicionado o soro, se a primeira leitura (tempo 0) for inferior a 0,800 D.O., estando o substrato (Reagente A) em condições, indica uma amostra com atividade muito alta de LDH (que consome NADH ainda antes desta leitura). Neste caso, repetir a determinação com amostra diluída 1/10 com solução fisiológica e multiplicar o resultado pela diluição efetuada.

- A umidade é causa de deterioração do Reagente A.

DESEMPENHO

a) Reprodutibilidade: processando simultaneamente duplicatas das mesmas amostras, obtiveram-se os seguintes dados:

Nível	D.P.	C.V.
438 U/l	± 5,14 U/l	1,17 %
683 U/l	± 7,99 U/l	1,17 %

b) Limite de detecção: depende do fotômetro e da comprimento de onda empregada. De acordo com a sensibilidade necessária, em espectrofotômetro a 340 nm (334 Hg ou 366), com cubetas de faces paralelas de 1 cm de espessura, reprodutibilidade ± 2 nm, luz espúria $\leq 0,5\%$ e banda de passagem ≤ 8 nm, para um $\Delta A/\text{min}$ de 0,001, a variação mínima de atividade detectável será de 5 U/l (a 340 nm e 25°C).

c) Faixa dinâmica: a faixa útil de leitura se estende até 0,200 $\Delta A/\text{min}$ (340 nm e 25°C). Se o $\Delta A/\text{min}$ é superior a 0,200 D.O. (340-334 nm e 25°C) ou 0,100 D.O. (366 nm e 25°C), repetir a determinação com amostra diluída 1/5 ou 1/10 com solução fisiológica, corrigindo conseqüentemente os resultados.

PARÂMETROS PARA ANALISADORES AUTOMÁTICOS

Para a programação consultar o Manual de Uso do analisador a ser utilizado.

APRESENTAÇÃO

- 3 x 20 ml (Cód. 1521303).

REFERÊNCIA

- Societé Français de Biologie Clinique (SFBC) - Ann. Biol. Clin. 40: 160, 1982.
- Sociedad Española de Química Clínica. Comité Científico, Comisión de Enzimas. - Quím. Clin. 57-61, 1989.
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4th ed., 2001.

Símbolos

Os seguintes símbolos são utilizados nos kits de reagentes para diagnóstico da Wiener lab.



Este produto preenche os requisitos da Diretiva Européia 98/79 CE para dispositivos médicos de diagnóstico "in vitro"



Elaborado por:



Representante autorizado na Comunidade Européia



Nocivo



Uso médico-diagnóstico "in vitro"



Corrosivo / Caústico



Conteúdo suficiente para <n> testes



Irritante



Data de validade



Consultar as instruções de uso



Limite de temperatura (conservar a)



Calibrador



Não congelar



Controle



Risco biológico



Controle Positivo



Volume após da reconstituição



Controle Negativo



Conteúdo



Número de catálogo



Número de lote