

## Utilização prevista

Para a determinação cinética quantitativa *in vitro* da atividade de desidrogenase láctica no soro utilizando os analisadores Yumizen C230 e Yumizen C240.

**Rx Only.**

## Relevância clínica

Níveis aumentados de LD estão associados a enfarte do miocárdio. Os níveis atingem o seu máximo aproximadamente 48 horas após o início de dor e persistem durante cerca de dez dias. O grau de elevação é útil para avaliar a extensão dos danos e para desenvolver um prognóstico. São também observadas elevações de LD em doença hepática, anemia perniciosa, em alguns casos de doença renal e em alguns casos de trauma musculoesquelético.<sup>1</sup>

## História dos métodos

Wroblewski e Ladue<sup>2</sup> publicaram o primeiro método cinético UV para a determinação da atividade de LDH no soro em 1955. O seu método era baseado no ensaio clássico de Kubowitz e Ott<sup>3</sup> (1943) utilizando a reação de piruvato em lactato. Em 1956, Wacker et al<sup>4</sup> descreveram um procedimento que seguiu uma reação de lactato em piruvato. A reação de lactato em piruvato passou a ser a reação preferida<sup>5</sup>, embora fosse a mais lenta das duas, por ter um intervalo linear mais amplo<sup>6</sup> e pelo facto de não necessitar de qualquer requisito de pré-incubação<sup>7</sup>. O presente método segue a reação prévia e foi otimizado para uma maior sensibilidade e linearidade, tal como referido por Gay et al.<sup>8</sup>

## Princípio

LD

L-lactato + NAD<sup>+</sup> -----> Piruvato + NADH + H<sup>+</sup>

A desidrogenase láctica catalisa a oxidação do lactato em piruvato com redução simultânea de NAD para NADH. A taxa de redução de NAD pode ser medida como um aumento da absorvância a 340 nm. Esta taxa é diretamente proporcional à atividade de LD no soro.

## Composição do reagente

Depois de combinar R1 e R2, o reagente contém: NAD 5,8 mM, L-lactato 55 mM, tampão pH 8,95. Estabilizadores não reativos e azida de sódio (0,1%) como conservante.

## Preparação dos reagentes

Os reagentes são fornecidos sob a forma de líquidos prontos a utilizar.

## Armazenamento e estabilidade dos reagentes

Os reagentes mantêm-se estáveis até à data de validade, quando armazenados conforme as instruções. Proteger da luz. Evitar a contaminação microbiana.

## Precauções

- Este reagente destina-se apenas a diagnóstico *in vitro*.
- Os reagentes contêm azida de sódio (0,1%) como conservante. Não ingerir. Evitar o contacto com a pele e com os olhos. A azida de sódio pode reagir com canalização de chumbo e cobre, originando azidas de metal explosivas. Escove com água abundante ao eliminar o reagente.
- Todas as amostras e controlos devem ser manuseados de acordo com as boas práticas laboratoriais, utilizando as precauções adequadas conforme descrito no Manual da CDC/NIH, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 2.<sup>a</sup> ed., 1988, N.º de publicação do HHS (CDC) 88-8395.

## Colheita e armazenamento de amostras

- Recomenda-se a utilização de soro não hemolisado. Os glóbulos vermelhos contêm concentrações elevadas de LD.<sup>5</sup>
- O soro deve ser removido do coágulo rapidamente.
- As amostras devem ser analisadas logo após a colheita. A LD no soro mantém-se estável durante dois a três dias à temperatura ambiente.<sup>9</sup>
- Não congele nem exponha o soro a temperaturas elevadas (37°C), pois tal pode inativar as isoenzimas de LD termolábeis.<sup>10</sup>
- A colheita de amostras deve ser realizada de acordo com o documento NCCLS M29-T2.<sup>11</sup> Nenhum método pode oferecer garantias absolutas de que as amostras de sangue humano não transmitirão infeções. Por conseguinte, todas as amostras devem ser consideradas potencialmente infecciosas.

## Interferências

- Determinados medicamentos e substâncias afetam a atividade da LD. Consulte Young, et al.<sup>12</sup>
- Verificou-se que a bilirrubina até ao nível de 20 mg/dL apresenta uma interferência negligenciável ( $\leq 5\%$ ) neste ensaio.
- Demonstrou-se que a hemólise interfere significativamente no ensaio, mesmo em níveis baixos como 100 mg/dL.

## Materiais fornecidos

Reagente (R1) de tampão de desidrogenase láctica  
 Reagente (R2) coenzimático de desidrogenase láctica

## Materiais necessários, mas não fornecidos

- Analisador Yumizen C230/Yumizen C240
- Manual de utilização do Yumizen C230/Yumizen C240
- Controlo de Química Pointe, número de catálogo C7592-100

## Parâmetros de teste

Teste:	LDH	Química:	Desidrogenase Láctica
N.º de química:	223	Nome de imprensa:	LDH
Tipo de reação:	Cinética	Direção de reação:	Positiva
Onda pri.:	340 nm	Onda sec:	405 nm
Decimal:	0	Tipo de amostra:	Soro
Tempo de branco:		Tempo de reação:	3 11
Unidade:	U/L	Tempo de incubação:	3

	Vol. de amostra	Aspirado	Diluído	Vol. de reagente	Diluído	
Padrão;	11	uL	uL	180	uL	uL
Diminuído;		uL	uL	45	uL	uL
Aumentado;		uL	uL	uL		

Intervalo de linearidade (padrão); 0-1000	Limite de linearidade: 0.3
Intervalo de linearidade (diminuído):	Redução de substrato: 23000
Intervalo de linearidade (aumentado):	Abs. de branco misturado: - 40000 40000
Abs. de branco R1: - 40000 40000	Estabilidade no equipamento: 30 Dia(s)
Resposta de branco - 40000 40000	Limite de alarme do reagente: 5
Química dupla:	

Verificação prozona:		
Q1:	Q2:	Q3:
Q4:	PC:	ABS:

Utilizar resultado qualitativo:	
Intervalo:	Referência:

Desvio de declive:			
Declive	Desvio	Unidade	
1	0	U/L	

Pré-tratamento:	
Vol. de amostra pré-tratada: uL	Vol. de reagente pré-tratado: uL

Intervalo de ref.:					
Tipo de amostra:	Sexo:	Intervalo de idades:	Intervalo de ref.:	Intervalo crítico:	Unidade:

# Conjunto de Reagentes de Desidrogenase Láctica Líquida Pointe

## Parâmetros de configuração da calibração

Quím:	LDH	Calibrador	Conc.	Pos	N.º do lote
Definição da calibração		Água	0,0	W	
Modelo matemático: Fator K					
Fator: 3907,000 Réplicas: 2					
Limites de aceitação					
Tempo cal: 24 h					
Dif declive:	DP:				
Sensibilidade:	Repetibilidade:	* Definida pelo utilizador			
Deter coef:					
Calib. auto.					
	<input type="checkbox"/> Tempo cal				

## Limitações

- O soro hemolisado causa níveis séricos de LD erradamente elevados.
- As amostras que excedem o limite de linearidade (1000 U/L) devem ser diluídas com um volume igual de solução salina e novamente submetidas a ensaio. Multiplique os resultados por dois para compensar a diluição.

## Calibração

O procedimento é padronizado através da capacidade de absorção milimolar do NADH considerada como 6,22 a 340 nm nas condições de teste descritas.

## Controlo da qualidade

A validade da reação deve ser monitorizada utilizando amostras de controlo com valores de LD normais e anormais conhecidos. Estes controlos devem ser efetuados, pelo menos, em cada turno de trabalho em que sejam realizados ensaios de LD. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça a sua própria frequência de determinação de controlo. Os requisitos de controlo de qualidade devem ser executados em conformidade com os requisitos de acreditação e regulamentação local, estatal e/ou federal.

## Cálculo (exemplo)

Uma Unidade internacional (U/L) é definida como a quantidade de enzima que catalisa a transformação de um micromole de substrato por minuto.

$$IU/L = \frac{(A_2 - A_1) \times 1.050 \times 1000}{1 \times 6,22 \times 0,050 \text{ mL}} = (A_2 - A_1) \times 3376$$

Em que:

(A<sub>2</sub>-A<sub>1</sub>) = Alteração da absorvância  
 1,050 = Volume de reação total em mL  
 1000 = Conversão de U/mL para U/L  
 1 = Trajetória da luz em cm  
 6,22 = Capacidade de absorção milimolar de NADH  
 0,050 = Volume de amostra em mL

Exemplo: Se a leitura inicial (A<sub>1</sub>) = 0,450  
 Leitura final (A<sub>2</sub>) = 0,480  
 (A<sub>2</sub>-A<sub>1</sub>) = 0,03  
 Então, 0,03 x 3376 = 101 U/L

Nota: No caso de unidades do SI (nkat/L), multiplique o resultado por 16,76.

## Valores esperados<sup>5</sup>

Sexo masculino 50-166 U/L (30°C) 80-285 U/L (37°C)  
 Sexo feminino 60-132 U/L (30°C) 103-227 U/L (37°C)

Devido a uma ampla variedade de condições (alimentares, geográficas, etárias, etc.) que afetam os intervalos de referência, recomenda-se que cada laboratório estabeleça o seu próprio intervalo de referência.

## Desempenho

- Ensaio: 0-1000 U/L. As amostras que excedem 1000 U/L devem ser diluídas com um volume igual de solução salina, novamente submetidas a ensaio e os resultados devem ser multiplicados por dois.
- Correlação: Foi realizado um estudo entre os analisadores da série Yumizen 200 e um analisador semelhante utilizando este método, tendo resultado num coeficiente de correlação de 0,999 com uma equação de regressão de y=1,013x + 4,1.

- Precisão: Foram realizados estudos de precisão na sequência de uma modificação das diretrizes constantes do documento NCCLS EP5-T2.<sup>12</sup>

Na mesma determinação			Entre dias		
Média	D.P.	% C.V.	Média	D.P.	% C.V.
131,6	4,4	3,4	114,4	2,3	2,0
331,5	6,4	1,9	331,3	7,0	2,1

- Sensibilidade: A sensibilidade do reagente de LD líquido foi investigada através da leitura das alterações na absorvância a 340 nm para uma amostra de água desionizada e amostras de soro com atividades de LD conhecidas. Foram realizadas dez réplicas de cada amostra. Os resultados desta investigação indicaram que, no analisador utilizado, o reagente de LD líquido exibiu pouco ou nenhum desvio de reagente numa amostra zero. Nas condições de reação descritas, uma alteração da absorvância de 0,0001 foi aproximadamente equivalente a 1 U/L de atividade de LD.

## Bibliografia

- Tietz, N.W., editor, Fundamentals of Clinical Chemistry, 3<sup>rd</sup> Ed., W.B. Saunders Co., 391 (1987).
- Wroblewski, F., LaDue, J.S., Proc. Soc. Data Biol. Med. 90:210 (1955).
- Kubowitz, F., Ott, P., Biochem. 314:94 (1943).
- Wacker, W.E.C., et al, N. Engl. J. Med. 255:449 (1956).
- Henry, R.J. et al, Clinical Chemistry; Principles and Technics, 2<sup>nd</sup> Ed., Hagerstown (MD) Harper & Row, pp. 819-831. (1974).
- Amador, E., et al, Clin. Chem. 9:391 (1963).
- Buhl, S.N., et al, Clin. Chem. 23:1289 (1977).
- Gay, R.J., McComb, R.B., Bowers, G.N., Clinical Chemistry, 2<sup>nd</sup> Ed., W.B. Saunders Co., 657 (1976).
- Tietz, N.W., Fundamentals of Clinical Chemistry, 2<sup>nd</sup> Ed., W.B. Saunders Co., 657,(1976).
- Kreutzer, H.H., et al, Clin. Chim. Acta 9:64 (1964).
- NCCLS Document M29-T2, 2<sup>nd</sup> Ed. (1991).
- Young, D.S., et al, Clin. Chem., 21:1D (1975).
- NCCLS Document "Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices", 2<sup>nd</sup> Ed. (1992).

## Legenda dos símbolos

Utilizar até (AAAA-MM-DD)	Lote e código
Número de catálogo	Fabricante
Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>	Limite de temperatura
Consulte as instruções de utilização	Marcação CE
<b>Rx Only:</b> Utilização apenas mediante receita médica	
Representante autorizado na Comunidade Europeia	

12-L7572-100 Fabricado por HORIBA Instruments Incorporated - Pointe Brand 5449 Research Drive Canton, MI 48188

Fabricado por HORIBA Instruments Incorporated – Pointe Brand  
 5449 Research Drive, Canton, MI 48188

Representante Europeu Autorizado:  
 Obelis s.a.

Boulevard Général Wahis 53  
 1030 Brussels, BÉLGICA  
 Tel.: (32)2.732.59.54 Fax: (32)2.732.60.03 e-mail: mail@obelis.net

## Certificada para executar reagentes

Os reagentes Pointe são certificados para serem fabricados de acordo com parâmetros especificados. Qualquer produto de reagente Pointe que não cumpra as especificações até à data de validade indicada será regularizado imediatamente sem quaisquer custos.