

LDH Cepa - Cinética UV

Método

Piruvato – Cinético UV

Finalidade

Kit para determinação da desidrogenase láctica em amostras de soro ou plasma.

Princípio do método

A desidrogenase láctica (LDH) catalisa a redução do piruvato pelo NADH, que é convertido em lactato, transformando o NADH em NAD. A concentração catalítica é determinada a partir da velocidade de extinção do NADH, medida espectrofotometricamente em 340 nm.

Reagentes fornecidos

1. Tampão: Tris 100 mmol/L, piruvato 2,75 mmol/L e cloreto de sódio 222 mmol/L; pH 7,2 (1 x 40 mL).
2. Coenzima: NADH 1,55 mmol/L, azida sódica 9,5 g/L. Não pipetar com a boca (1 x 10 mL).

Condições de uso e armazenagem

A data de validade aparece no rótulo da embalagem. Não usar reagentes cuja data de validade tenha expirado. Todos os reagentes devem ser mantidos sob refrigeração na faixa de 2 a 8°C. Manter ao abrigo da luz. Os reagentes devem permanecer fora do refrigerador somente o tempo necessário para as dosagens.

Insumos e equipamentos necessários não fornecidos

- Água destilada ou deionizada
- Banho-maria
- Cronômetro
- Espectrofotômetro
- Pipetas manuais ou automáticas
- Ponteiras descartáveis
- Vidraria

Precauções e cuidados especiais

- Somente para uso diagnóstico "in vitro".
- Não misturar ou trocar lotes de reagentes diferentes.
- Evitar contaminação microbiana dos reagentes e não utilizar reagentes que tenham sinais de contaminação ou precipitação.
- Caso haja contato com quaisquer reagentes lavar a área afetada com água em profusão. Em caso de ingestão de reagentes procurar auxílio médico imediato munidos desta instrução de uso.
- Utilizar equipamentos de proteção individual segundo normas de biossegurança.
- A água (destilada ou deionizada) utilizada na limpeza do material ou nos procedimentos deve ser recente e isenta de agentes contaminantes.
- Certificar-se das condições adequadas de funcionamento dos equipamentos de análise.
- O descarte do material utilizado deve ser feito segundo os critérios de biossegurança.
- Lavar as mãos após trabalhar com material potencialmente infeccioso.

Amostra biológica

- Soro ou plasma.

A LDH em soro ou plasma é estável durante 24 horas quando mantida entre 2 a

8°C. Utilizar apenas heparina como anticoagulante.

Todo o material biológico deve ser processado como sendo potencialmente contaminante. Usar luvas descartáveis durante a manipulação do material biológico. As amostras devem ser descartadas, após o uso, em recipientes específicos para este fim. Não dispensar em coletores de lixo comuns ou nas redes de esgoto.

Procedimento

Ler, cuidadosamente, as instruções desta bula.

Preparo dos reagentes:

Verter o conteúdo do frasco de Reagente nº 2 (Coenzima) no frasco de Reagente nº 1 (Tampão) e homogeneizar bem. É recomendável a transferência de parte do homogeneizado para o frasco de reagente nº 2, com o objetivo de se obter a diluição completa do reagente contido no mesmo. Após homogeneizar, verter novamente o conteúdo do frasco nº 1 e rotular como Reagente de Trabalho. Este reagente é estável, durante 2 meses quando mantido entre 2 a 8 °C. Obs.: podem ser preparados volumes menores de reagente de trabalho, desde que respeitada a proporção de 1 mL de Coenzima + 4 mL de Tampão.

Dosagem em soro ou plasma:

1. Permitir que reagentes e amostras atinjam a temperatura ambiente;
2. Pré-aquecer o espectrofotômetro e o reagente de trabalho a 37 °C;
3. Acertar o zero do espectrofotômetro utilizando água destilada ou deionizada.
4. Pipetar em uma cubeta termostatzada a 37°C como a seguir:

Método	Micro	Macro
Amostra	10µL	20 µL
Reagente de trabalho	0,5mL	1,0mL

5. Homogeneizar rapidamente e inserir em um porta cubetas termostatzado a 37 °C e acionar o cronômetro.
6. Aos 30 segundos, determinar e registrar a absorbância inicial (A_0) em 340 nm; realizar novas leituras (A_1 , A_2 e A_3), em intervalos de 1 minuto durante 3 minutos;
7. Comprovar que as diferenças entre as absorbâncias sejam sensivelmente iguais. Calcular a média das diferenças das absorbâncias ($\Delta A/\text{min}$), que será usada nos procedimentos de cálculo.

$$DA / \text{min} = \frac{((A_1 - A_0) + (A_2 - A_1) + (A_3 - A_2))}{3}$$

Cálculos

Considerando que o coeficiente de absorção molar do NADH a 340 nm é 6.300, se deduzem as seguintes fórmulas para calcular a concentração catalítica:

- Desidrogenase láctica (U/L) = DA/min x 8095

Unidades SI: $\mu\text{kat/L} = \text{U/L} \times 0.0167$

Linearidade

A reação é linear até 1250 U/L; para concentrações superiores, diluir a amostra com solução de NaCl 0,85% e repetir a dosagem. Multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição empregado.

Valores de referência

- Soro ou Plásmas: 207 a 414 U/L*
- Estes valores são dados apenas a título orientativo. É recomendável que cada laboratório estabeleça sua própria faixa de valores de referência.

Controle de qualidade

O laboratório deve ter como prática de rotina o uso de soros controle comerciais. Preferivelmente deve participar de programas de controle externo de qualidade, a exemplo daqueles oferecidos pela SBAC e SBPC.

Dados estatísticos de desempenho do teste

Recuperação: 101,3%.

Coeficiente de variação intra-ensaio (repetitividade): A realização de 20 determinações de uma mesma amostra com valor dentro da faixa de referência, mostrou um coeficiente de variação igual a 4,50%. O mesmo procedimento para valores elevados mostrou um coeficiente de variação igual a 3,25%.

Coeficiente de variação inter-ensaio (reprodutibilidade): A realização de 20 determinações de uma mesma amostra com valor dentro da faixa de referência, mostrou um coeficiente de variação igual a 6,50%. O mesmo procedimento para valores elevados mostrou um coeficiente de variação igual a 4,80%.

Especificidade analítica: A comparação com método similar validado (que também utiliza a metodologia enzimática no ultravioleta) demonstrou um coeficiente de correlação, igual a 0,991 a partir da análise de amostras aleatórias oriundas de pacientes de ambulatório. A equação de regressão obtida foi: $y = 1,16x + 13,8$.

Sensibilidade analítica: O método apresenta uma variação de absorbância em 340 nm igual a 0,000124 em cada acréscimo de 1U/L na concentração de LDH. O limite de detecção do método é igual a 40 U/L.

Interferentes

Hemólise ou separação tardia do soro ou plasma leva a resultados falsamente elevados, em função da elevada concentração de LDH nos eritrócitos.

Referências bibliográficas

ANN bio clin 1982; 40:87-164 - Recomendações pour la mesure de la concentration catalytique de lactate deshidrogenase dans le serun humana 30 °C.

Apresentação

Número de testes Macro: 50

Número de testes Micro: 100

Automação

Os reativos podem ser utilizados em analisadores automáticos. Vide programação no verso ou solicite informações ao seu distribuidor.

Dados do fabricante

MBiolog Diagnósticos Ltda

Rua Gama, 337 – Vila Paris – Contagem – MG – CEP 32372-120

Resp. Técnico: Fabrício Galvão de Brito – CRF-MG 9587

SAC - Serviço de Atendimento ao Cliente

☎ (31) 3507 0707

✉ sac@mbiolog.com.br

COBAS MIRA/ PLUS®			
GENERAL			
MEASUREMENT MODE	ABSORB		
REACTION MODE	R-S - 1		
CALIBRATION MODE	FACTOR - 2		
REAGENT BLANK	REAG/DIL - 2		
CLEANER	NO - 1		
WAVELENGTH	340 nm - 1		
DECIMAL POSITION	0 (U/L)		
UNIT	21 (U/L)		
ANALYSIS			
POST. DIL FACTOR	5		
CONC. FACTOR	NO - SPACE		
SAMPLE CYCLE	1		
VOLUME	5 µL		
DILUTION NAME	H2O - 0		
VOLUME	10 µL		
REAGENT CYCLE	1		
VOLUME	150 µL		
CALCULATION			
SAMPLE LIMIT	NO - SPACE		
REACTION DIRECTION	DECREASE - 2		
CHECK	ON - 1		
CONVERSION FACTOR	1		
OFFSET / TEST RANGE	0 / 0		
HIGH	1500 U/L		
NORMAL RANGE LOW	207		
HIGH	414		
NUMBER OF STEPS	1		
CALCULATION STEP A	KINSEARCH -3		
READING FIRST	1		
LAST	7		
CALIBRATION			
CALIBRATION INTERVAL	ON REQUEST - 3		
TIME	NO - SPACE		
REAGENTE RANGE LOW	NO - SPACE		
HIGH	NO - SPACE		
BLANK RANGE LOW	-0,20 ÅÅ		
HIGH	0,20 ÅÅ		
FACTOR			
Utilizar calibrador ou soro controle para verificar os parâmetros da programação e, se necessário, para ajuste do fator.			

EXPRESS 550/PLUS®			
TEST NAME: LDH		TEST: LDH	
TEST BAR CODE: IPU*			
TEST TYPE: KINETIC		CURVE TYPE: BLANK. LINEAR	
UNITS: U/L		Nº OF DECIMAL PLACE: 0	
PRIMARY WAVELENGHT: 340		SECONDARY WAVELENGHT: -	
READ TIME / INTERVAL:30		SAMPLE BLANK: NO	
FACTOR: - 9683			
CALIBRATION INTERVAL: 180 h		Nº OF REPLICATES: 2	
Nº OF CALIBRATOR: IPU*			
LOW BLANK A LIMIT: -0,100		HIGH BLANK A LIMIT: 2,000	
LOW A LIMIT: -0,100		HIGH A LIMIT: 2,000	
LOW NORMAL: 207		HIGH NORMAL: 414	
LINEARITY LIMIT: 1500		CURVE S.D. LIMIT: 10	
SAMPLE VOLUME: 7 µL		TEST: LDH	
SAMPLE DILUENTE BOTTLE TYPE:		PREDILUTION RATIO: 1	
RERUN DIL. RATIO : 2		REAGENT DILUENTE BOTTLE*	
REAGENT DILUENT:	VOL. RAG.	BD DIL	LAG TIME BT
REAGENT 1:	300	60	*
IPU: Inserido Pelo Usuário			
*: Entre com o tipo de frasco utilizado. Plástico ou Vidro			
Utilizar calibrador ou soro controle para verificar os parâmetros da programação e, se necessário, para ajuste do fator.			
BIO2000® & LABQUEST®			
MODO	CIN	INT. CIN	60
WLI	340	Nº DE INTERV	3
WL2	ÅÅ LIMIT		
TEMP?	37°C	% LIM LIN	20
VOL ASP	800	DIR	DEC
RETARDO	30	ABS REAT MIN	0
FATOR	ABS REAT MIN		
UNDIDAD	U/L	VR/VN MIN	207
DECIMALS	0	VR/VN MAX	414
IMPRESSÃO	EXT		

RA-50®	
TEMPERATURA	37 °C
VOLUME DA AMOSTRA	20 µL
VOLUME DO REAGENTE	1000 µL
FATOR	8095
TIPO DE REAÇÃO	CINÉTICA
UNIDADES	U/L
COMPRIMENTO DE ONDA	340 nm
INTERVALO DE TEMPO	60
ESTABILIZAÇÃO	30
NÚMERO DE LEITURAS	3
INCLINAÇÃO DA REAÇÃO	DECRESCENTE
ABS. MIN INICIAL	1
LINEARIDADE	1250 U/L
PRECISÃO DO RESULTADO	1 U/L
VOLUME DE ASPIRAÇÃO	800 µL
Utilizar calibrador ou soro controle para verificar os parâmetros da programação e, se necessário, para ajuste do fator.	
RA-100®	
TEST N° / TEST NAME	LDH
UNITS	U/L
LOW NORMAL	207
HIGH NORMAL	414
FACTOR	
STAND. CON	-
TYPE	2
WAVELENGTH	340
SAMPLE VOLUME	6
SAMPLE PRIME VOL.	2,5
SAMPLE FLUSH VOL.	250
REAGENT. VOL	300
REAG. PRIME VOL.	12,5
REAG. FLUSH VOL.	450
INCUBATION TIME	35
READ TIME	140
REAG. ABS LOW	0,8
REAG. ABS HIGH	1,8
REACT. ABS LOW	0,05
REACT. ABS HIGH	1,8
MAX LIN RSLT	0,16
TEMPERATURA	37 °C
IPU* Inserido Pelo Usuário	
Utilizar calibrador ou soro controle para verificar os parâmetros da programação e, se necessário, para ajuste do fator.	

BTS-310®	
NOMBRE TECNICA	LDH
UNIDADES	4
MODO DE CÁLCULO	CDF
MODO DE LECTURA	-
FILTRO REFERENCIA	-
FILTRO LECTURA	340
FATOR	
TIEMPO ESTIBILIDAD	1
TIEMPO INCUBACION	30
TIEMPO INTERVALO	60
NÚMERO DE INTERVALOS	3
VOLUME DE ASPIRACIÓN	400
TIPO DE REACION	Decrescente
ESTANDAR / N° ESTANDARTES	-
DUP. ESTANDARTES	-
DUP. MUESTRAS	-
ESCALAS ABS / CON.	-
FACTOR DILUCION	-
TEMPERATURA	37°C
Utilizar calibrador ou soro controle para verificar os parâmetros da programação e, se necessário, para ajuste do fator.	
ABBOT VP®	
NAME INDEX – TES NAME	15 (LDH)
TEMPERATURE	37°C
FILTER ID CODE	43 (340/380)
UNITS	07 (U/L)
DILUTION 1:	101 (1:101)
REV. TIME	2
AUX. DISP	NO
FRR	YES
REACTION UP	NO
STANDARDS	NO
REAG. BLANK	NO
ASSAY FACTOR	
END. POINT	NO
BGN PRT REVOVUTION	3
PRT REVOLUTION	1
INITIAL REAG. AD	0,5
UP LIMIT	NO
MAX ABS. LIMIT	3
SUBSTRAT DEPLECTION	0,3
REAGENT DEGRADATION	50
Utilizar calibrador ou soro controle para verificar os parâmetros da programação e, se necessário, para ajuste do fator.	
Todos os equipamentos são marcas registradas de seus fabricantes	