

FINALIDADE

Sistema cinético para determinação da Deidrogenase Láctica (DHL) no soro ou plasma.

Somente para uso diagnóstico in vitro.

PRINCÍPIO



A deidrogenase láctica (DHL) catalisa a conversão do piruvato para lactato e paralelamente a coenzima NADH é oxidada a NAD^+ . A coenzima NADH tem um coeficiente de absorção molar elevado em 340 nm, sendo quase nula a absorção de NAD. A oxidação de NADH é diretamente proporcional à atividade da DHL. A atividade enzimática é então calculada através da diminuição da absorvância da solução de NADH em 340nm.

METODOLOGIA

Cinético, ultravioleta.

REAGENTES

Reagente 1: Tris 100mmol/L, Piruvato 2,75mmol/L, Cloreto de Sódio 222mmol/L, pH 7,2.

Reagente 2 NADH 1,55 mmol/L, Azida sódica 9,5g/L.

APRESENTAÇÃO

Reagente 1 4 x 8 mL
Reagente 2 4 x 2 mL

NÚMERO DE TESTES

Sistema manual: 40 testes

Sistemas automáticos: 160 testes

Protocolos de automação encontram-se disponíveis no site Doles ou através do Serviço de Atendimento ao Consumidor.

EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

- Espectrofotômetro com leitura em 340nm, cubeta termostatizável, com 10mm de passagem de luz e banda espectral de 8nm ou menos.
- Pipetas graduadas
- Pipeta semiautomática de 20µL.
- Ponteiras descartáveis
- Cronômetro

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Reagente 1: armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, se obedecidas as condições de armazenamento.

Reagente 2: armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, se obedecidas as condições de armazenamento.

Reagente de Trabalho: armazenar à temperatura de 2-8°C, estável por 02 meses após o preparo.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES COM O USO DOS REAGENTES

Os reagentes são somente para **uso diagnóstico in vitro**. Seu manuseio deve ser cuidadoso, evitando-se contato com pele e mucosas. Em caso de contaminação acidental, lavar a parte afetada em água corrente. O descarte do material utilizado deverá ser feito obedecendo-se aos critérios de biossegurança estabelecidos pelo laboratório, de acordo com as normas locais, estaduais ou federais.

Observar ainda a simbologia constante nos rótulos do produto:



Irritante

AMOSTRA

Soro ou plasma (colhido com heparina).

Devido aos altos níveis de DHL nos eritrócitos não utilizar amostras hemolisadas.

A atividade enzimática mantém-se inalterada por 24 horas, à temperatura de 2-8°C.

Todas as amostras biológicas devem ser consideradas como potencialmente infectantes.

PROCEDIMENTO TÉCNICO

• Preparo do Reagente de Trabalho:

Transferir o reagente 2 para o frasco de Reagente 1 e homogeneizar.

Estável por 2 meses após o preparo quando armazenado à temperatura de 2-8°C.

Realização do teste:

1. Transferir 1mL do reagente de trabalho para um tubo de ensaio e deixá-lo por alguns minutos à temperatura ambiente.
2. Adicionar 20µL da amostra ao reagente de trabalho e homogeneizar com ligeira agitação.
3. Transferir a solução para a cubeta termostatizada a 30°C/37°C (por aspiração em equipamentos dotados de cubeta de fluxo).
4. Esperar 30 segundos.
5. Fazer a leitura inicial em absorvância, disparando simultaneamente o cronômetro. Anotar o achado.
6. Repetir as leituras em intervalos de 1, 2 e 3 minutos.
7. Calcular a média das diferenças de absorvâncias por minuto ($\Delta A/\text{minuto}$), utilizando-se para calcular o resultado.
8. Processando-se a reação enzimática a 30°C, o resultado encontrado pode ser expresso em temperatura de 37°C, multiplicando-se o valor encontrado por 1,46. Inversamente, valores a 37°C podem ser expressos a 30°C dividindo-se o valor encontrado por 1,46.

CÁLCULO

$\text{DHL (U.I./L)} = \Delta A/\text{minuto} \times 8109$

Exemplo:

Leitura inicial (após 30 segundos de incubação) = 1,727

Leitura (1º minuto) = 1,711 $\Delta A = 1,727 - 1,711 = 0,016$

Leitura (2º minuto) = 1,695 $\Delta A = 1,711 - 1,695 = 0,016$

Leitura (3º minuto) = 1,679 $\Delta A = 1,695 - 1,679 = 0,016$

$$\Delta A/\text{minuto} = \frac{\Delta A \text{ 1º minuto} + \Delta A \text{ 2º minuto} + \Delta A \text{ 3º minuto}}{3}$$

$$\Delta A/\text{minuto} = \frac{0,016 + 0,016 + 0,016}{3} = 0,016$$

$\text{DHL (U.I./L)} = 0,016 \times 8109 = 129,5$

DETERMINAÇÃO DO FATOR

$$\text{LDH (atividade U.I./L)} = \frac{\Delta A}{\text{min}} \times \frac{1}{6,3} \times \frac{1,02}{0,02} \times 1000 = \Delta A \times 8109$$

6,3 = absorção molar de NADH^+ (um µmol de NADH^+ em um mililitro de solução, cubeta de 10mm diâmetro interno, 340nm tem uma absorvância de 6,3).

1,02 = volume total da reação

0,02 = volume de soro

1000 fator / transformação de mililitro em litro.

LINEARIDADE

A reação é linear até uma concentração, aproximada, de 1257 U.I./L o que corresponde a um $\Delta A/\text{minuto}$ de **0,155**. Sendo o $\Delta A/\text{minuto} \geq 0,155$ diluir a amostra com solução fisiológica e repetir o teste. Multiplicar o valor encontrado pelo fator de diluição.



LIMITAÇÕES DO SISTEMA

- Para se obter ótimo desempenho do sistema, é necessário que o procedimento técnico seja rigorosamente seguido conforme instruções de uso. Alterações no procedimento técnico podem levar a resultados errôneos.
- Se a absorvância do reagente de trabalho quando lido frente a um branco de água for inferior a 1,000, não utilizá-lo pois o mesmo está deteriorado.
- Valores elevados de DHL podem ser encontrados em amostras hemolisadas.

CONTROLE DA QUALIDADE DO SISTEMA

1. A limpeza e a secagem adequada do material a ser utilizado são de fundamental importância para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
2. As pipetagens devem ser precisas.
3. O uso de soro controle de referência deve ser uma prática rotineira do laboratório. Recomenda-se utilizar um soro controle com valor na faixa de normalidade (**soro controle N - Doles**) e outro soro controle de valor elevado (**soro controle P - Doles**).

VALORES DE REFERÊNCIA

É recomendado que cada laboratório estabeleça sua própria faixa de valores de referência na população atendida.

Como orientação, sugerimos os seguintes valores:

140 - 280 U.I./L (30°C)

207 - 414 U.I./L (37°C)

SIGNIFICADO CLÍNICO

A DHL é encontrada no músculo cardíaco, musculatura esquelética, fígado, eritrócitos, pulmões e nos rins.

No infarto agudo do miocárdio, a DHL se eleva 24-48 horas após o infarto, alcançando seu valor máximo entre 48-72 horas, retornando lentamente (5 a 10 dias) aos valores normais.

A DHL pode estar aumentada no soro de pacientes com anemia megaloblástica e anemias hemolíticas devido aos fenômenos de hemólise e liberação da enzima intraeritrocitária.

As próteses valvulares cardíacas podem gerar grau de hemólise suficiente para alterar os valores séricos de DHL.

A DHL encontra-se elevada em pacientes com embolia pulmonar, portadores de neoplasias malignas, leucemia e uremia.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Foram realizados 40 dosagens em amostras cujos níveis de DHL situavam-se no intervalo de 65,6 e 1095 U.I./L. As mesmas feitas em paralelo com o kit de DHL Doles (Y) e um produto comercial com metodologia similar (X) deram origem à seguinte equação de regressão linear: $Y = 6,37 + 0,99X$, sendo o coeficiente de correlação de 0,99.

Repetitividade: foram realizadas 20 dosagens sucessivas, com 2 amostras, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2
Concentração (U.I./L)	179,9	847,9
Desvio padrão	4,61	4,7
Coefficiente de variação (%)	2,56	0,55

Reprodutibilidade: foram realizadas 20 dosagens durante 20 dias consecutivos, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2
Concentração (U.I./L)	155,7	721,7
Desvio padrão	4,21	3,3
Coefficiente de variação (%)	2,70	0,46

Especificidade: a presente metodologia é específica para determinação de DHL.

Sensibilidade: utilizando-se de um espectrofotômetro de alta resolução, cubetas 10mm de passagem de luz e a 30°C, a variação de 0,001 na absorvância corresponde a 8,1 U.I./L de DHL.

Substâncias interferentes:

- Alguns medicamentos podem alterar os níveis de DHL sérica (ver Young D.S. et al., Clin. Chem. 21(5),1975 - Special issue).
- Não utilizar amostras hemolisadas, pois os eritrócitos são ricos em DHL.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Kaplan, L.A, Pesce, A.J., Clinical Chemistry, 3ªed, 608 - 610, 1996.
- Pagana K.D., Pagana T.J., Diagnostic and Laboratory Test Reference, 450-452, 1992.
- Anderson S.C., Cockayne S., Clinical Chemistry Concepts and Applications, 252-256, 1993.
- Burtis, C.A, Ashwood, E.D., Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2ªed., 816-818, 1994.
- Henry, J.B., *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 268-280, 19ª edição, 1996.
- Tibúrcio, H.M.: *Controle interno da qualidade analítica*, 1ªed. março/1995.
- Doles: dados de arquivo.

TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

As garantias do fabricante ao consumidor seguem estritamente as relacionadas na Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1.990 - **Código de Defesa do Consumidor**.

Todos os reagentes que compõem este sistema para diagnóstico são garantidos na sua performance, reprodutibilidade e qualidade até a data de vencimento dos mesmos, se obedecidas as condições abaixo:

1. O usuário do sistema seguir, rigorosamente, o procedimento técnico.
2. As condições de armazenamento deverão estar de acordo com o estabelecido nas instruções de uso.
3. Os materiais necessários e não fornecidos deverão estar em boas condições técnicas.

Todos os produtos que apresentarem problemas técnicos comprovados serão substituídos, sem ônus para o consumidor.

Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda.

CNPJ: 01.085.513/0001-05

Rodovia BR 153, Km 1273, Lt.07, Chácara Retiro

CEP: 74001-970 Goiânia - GO - Brasil

Caixa Postal 1051

e-mail: doles@doles.com.br

M.S.: nº 10231810070

Revisão: 14 (08/2009)

NBR ISO 9001

Sistema da Qualidade certificado desde 1999



SAC: (62) 3269 0000 (Grande Goiânia)

SAC: 0800 644 6433 (Demais localidades)

www.doles.com.br

doles