

FINALIDADE

Sistema colorimétrico para determinação de deidrogenase láctica no soro, plasma e líquido.

Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO

A deidrogenase láctica (DHL) é determinada em mistura de reagentes contendo lactato (substrato), difosfopiridino nucleótido (NAD), fenazina metossulfato (FMS), alumínio férrico e 1,10-fenantrolina, de acordo com o seguinte esquema:

- Lactato + NAD \longrightarrow NADH + piruvato
- NADH + FMS \longrightarrow NAD + FMS reduzido
- FMS red. + alumínio férrico \longrightarrow FMS + alumínio ferroso
- Alumínio ferroso + 1,10-fenantrolina \longrightarrow complexo corado

PARTICULARIDADES DO SISTEMA

Doles modifica a conhecida técnica de Whitaker, utilizando a reação lactato \longrightarrow piruvato, com determinação quantitativa e simultânea do NADH formado na reação enzimática. Simples e prática, a presente técnica alia as vantagens de um método espectrofotométrico com as facilidades instrumentais de um método fotocolorimétrico. As concentrações de substrato e coenzima apresentam-se otimizadas e os reagentes instáveis, liofilizados.

METODOLOGIA

Whitaker modificado.

REAGENTES

Substrato: solução 0,1M de Lactato, 0,005M de o-Fenantrolina em Tris 0,2M pH 8,8, 37°C.

Solução estabilizadora: Ácido Clorídrico 0,5M.

Alumínio Férrico: solução 0,012M de Sulfato de Ferro amoniacal.

NAD: cada frasco contém 130mg de NAD, sob forma liofilizada.

FMS: cada frasco contém, sob forma liofilizada, 4mg de Fenazina Metossulfato.

Solução padrão 350 U.I.L: cada 50µL corresponde a 350 U.I. de DHL.

APRESENTAÇÃO

Substrato	1 x	57mL
Solução estabilizadora	1 x	57mL
Alumínio Férrico	1 x	5mL
FMS (liofilizado)	1 x	4mg
NAD (frasco conta-gotas)	1 x	130mg
Solução padrão 350 U.I/L	1 x	3mL

NÚMERO DE TESTES

14 testes - 50µL amostra

28 testes - 25µL amostra

EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

- Espectrofotômetro ou fotocolorímetro capaz de medir a absorvância em **510nm** ou **filtro verde**.
- Tubos de ensaio.
- Pipetas graduadas.
- Pipetas semiautomáticas 50µL.
- Ponteiras descartáveis.
- Água deionizada ou destilada.
- Banho maria (37°C).
- Cronômetro.

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

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

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

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

Solução padrão 350 U.I.L: armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, se obedecidas as condições de armazenamento.

NAD: armazenar à temperatura de 2-8°C e ao abrigo da luz. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, se obedecidas as condições de armazenamento.

FMS: armazenar à temperatura de 2-8°C e ao abrigo da luz. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, se obedecidas as condições de armazenamento.

Reagente NAD-FMS: armazenar à temperatura de 2-8°C e ao abrigo da luz. Estável por 18 meses após o preparo.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES COM O USO DOS REAGENTES

Todos 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 área 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:



Corrosivo



Irritante

AMOSTRA

Soro, plasma (colhido com heparina), líquido. As amostras deverão ser separadas rapidamente (1 hora). Não usar amostras hemolisadas, pois os eritrócitos contêm 100 a 150 vezes mais DHL que o soro.

A atividade enzimática permanece estável por 3 dias sob refrigeração (2-8°C).

Todas as amostras biológicas devem ser consideradas como potencialmente infectantes.

PROCEDIMENTO TÉCNICO

Preparo do reagente NAD-FMS

Abrir o frasco envolto em papel rotulado **FMS** (contém Fenazina Metossulfato, extremamente sensível à luz). Adicionar 3,5mL de água destilada e agitar. Abrir o frasco conta-gotas e transferir para ele, imediatamente, toda a solução de **FMS**, que deve apresentar-se com tonalidade amarela intensa. Colocar o batoque conta-gotas e agitar durante alguns minutos até dissolução. Após reconstituído, tem-se solução 15,82mmolar de **NAD** e 3,73mmolar de **FMS**. Essa solução permanece estável durante 18 meses, sob refrigeração e ao abrigo da luz.

Identificar 2 tubos de ensaio com **T (teste)** e **B (branco)**.

Proceder como segue:

	T	B
Substrato	2,0mL	2,0mL
Alumínio Férrico	2 gotas	2 gotas
Amostra	50µL	-

Colocar em banho maria, a 37°C, durante 2 minutos.

NAD-FMS	2 gotas	2 gotas
---------	---------	---------

Misturar e incubar a 37°C, durante 5 minutos.

Solução estabilizadora	2,0mL	2,0mL
Amostra	-	50µL



Homogeneizar e ler a absorvância de (T) em espectrofotômetro ou fotocolorímetro, em **510nm** ou **filtro verde**, zerando o aparelho com o tubo **B (branco)**. A cor desenvolvida permanece estável por 30 minutos, à temperatura ambiente (20-30°C).

DETERMINAÇÃO DO FATOR (F)

Identificar 03 tubos com P (padrão).

Proceder como segue:

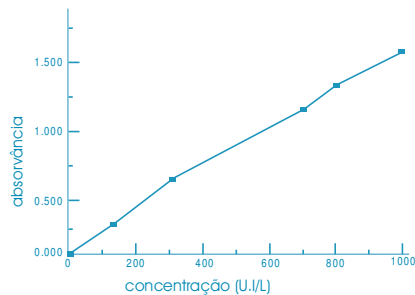
	P	P	P
Substrato	2,0mL	2,0mL	2,0mL
Solução Padrão	50µL	50µL	50µL

Homogeneizar e repousar por 2 minutos à temperatura ambiente (20 a 30°C).

Solução Estabilizadora	2,2mL	2,2mL	2,2mL
-------------------------------	-------	-------	-------

Homogeneizar e ler as absorvâncias do padrão em espectrofotômetro ou fotocolorímetro, em **510nm** ou **filtro verde**, zerando o aparelho com um branco representado por água destilada. Registrar as absorvâncias e calcular a média aritmética, que deverá ser utilizada para o cálculo do fator.

CURVA DE CALIBRAÇÃO



Padrão	Absorvância	Conc. (U.I./L)
1	0.000	0
2	0.240	140
3	0.590	350
4	1.175	700
5	1.340	800
6	1.610	1000

Obs.: Não utilizar esta curva para determinar o resultado de seu ensaio.

A curva de calibração é a representação gráfica da relação entre os valores das absorvâncias com os valores das concentrações de um conjunto de soluções padrão. São necessários três passos para confeccioná-la: (1) preparo das soluções padrão; (2) medição dos valores de absorvância das soluções padrão, de acordo com o especificado no procedimento técnico da presente instrução de uso, e (3) montagem de um gráfico em papel especial, linear, onde são relacionados os valores de absorvância com os de concentração, conforme demonstrado na figura acima.

As dosagens para montagem da curva foram feitas em um espectrofotômetro "Ultrospec III", Pharmacia Biotec, comprimento de onda de 510nm e cubetas com passagem de luz de 10mm.

A curva de calibração demonstra a linearidade da reação até uma determinada concentração, na qual pode ser determinado um fator de calibração (F), de acordo com a Lei de Beer. As curvas de calibração são utilizadas para substituir os cálculos matemáticos na determinação das concentrações das amostras. A leitura da amostra é localizada no gráfico apropriado e a concentração correspondente, determinada a partir da curva. Tal procedimento será válido se a leitura da amostra estiver no intervalo da linearidade da reação.

- **A reação é linear até 800 U.I./L (ver curva acima). Obtendo-se valores mais elevados, dilui-se a amostra com solução fisiológica e procede-se à nova dosagem. Multiplicar o valor encontrado pelo fator de diluição.**
- **O kit de Deidrogenase Láctica Doles possui padrão no intervalo de linearidade da metodologia adotada. O laboratório deve realizar o ensaio com o padrão que acompanha o kit e calcular seu fator de calibração (F), de acordo com o exemplo estabelecido nos cálculos.**

• **O fator deve ser refeito periodicamente e a cada lote do produto.**

• Os padrões utilizados na montagem da curva de calibração foram ajustados segundo trabalho original Whitaker, J.F. Clinical Chemistry. Acta, 24, 23-27, 1969.

CÁLCULOS

$$\text{Fator (F)} = \frac{350}{\text{absorvâncias P (média)}}$$

$DHL (U.I./L) = \text{absorvância T} \times \text{fator (F)}$

Exemplo:

Leituras:

(P) = 0,590; 0,589; 0,590

(T) = 0,200

$$\text{Média aritmética (P)} = \frac{0,590 + 0,589 + 0,590}{3} = 0,590$$

$$\text{Fator (F)} = \frac{350}{0,590} = 593$$

$$DHL (U.I./L) = 0,200 \times 593 = 118$$

Uma Unidade Internacional (U.I.) de DHL corresponde à formação de 1µmol de NADH por litro de soro por minuto, a 37°C.

EXPRESSÃO DOS RESULTADOS EM UNIDADES S.I.

Na presente técnica os resultados finais já são calculados em unidades S.I.

LIMITAÇÕES DO SISTEMA

Para se obter ótimo desempenho do sistema, é necessário que o procedimento técnico seja rigorosamente seguido conforme instruções de uso. Qualquer alteração poderá levar a resultados errôneos.

- Os fatores tempo e temperatura são críticos. A queda de 1°C na temperatura do banho maria condicionar uma diminuição de 7% na atividade do DHL. Um erro de 30 segundos leva a uma alteração de 10% da dosagem.
- Soro hemolisado não pode ser utilizado. As hemácias são ricas em DHL.
- Níveis elevados são observados na maioria dos pacientes com infarto do miocárdio, infarto pulmonar, cirrose e icterícia obstrutiva.
- Para um diagnóstico mais preciso, recomenda-se, paralelamente, a dosagem dos níveis de CK.

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.A água utilizada na limpeza do material, no preparo dos reagentes e na dosagem, deve ser de boa qualidade.
- 3.Colunas deionizadoras saturadas liberam íons diversos, amins e agentes oxidantes, que deterioram os reagentes.
- 4.As pipetagens devem ser precisas.
- 5.O nível da água do banho maria deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio. A temperatura (37°C) deve ser rigorosamente observada.
- 6.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:

Soro 80 - 220 U.I./L
Líquor 5 - 35 U.I./L



SIGNIFICADO CLÍNICO

Deidrogenase láctica (DHL): a DHL é encontrada no músculo cardíaco, fígado, eritrócitos, pulmões, musculatura esquelética e nos rins. No infarto agudo do miocárdio, a DHL torna-se elevada dentro de 24-48 horas após o infarto, atingindo um valor máximo entre 48-72 horas. A partir de então, lentamente (de 5 a 10 dias), retorna aos valores normais.

Na lesão hepatocelular aguda, o valor total da DHL não é tão sensível quanto o da AST. Na congestão hepática passiva, aguda ou crônica, de grau leve, a DHL apresenta-se muitas vezes normal, ou apenas levemente aumentada. Na congestão moderada ou grave, a elevação dos níveis de DHL varia, podendo ocorrer em menor ou maior grau.

As próteses valvulares cardíacas podem produzir grau suficiente de hemólise, a ponto de alterar os valores séricos de DHL. Além disso, a DHL mostra-se anormal em muitos pacientes com anemia megaloblástica e com anemias hemolíticas moderadas ou graves.

A DHL pode estar elevada em pacientes com embolia pulmonar, neoplasias malignas, leucemia ou uremia.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Foram realizados 44 testes em amostras cujos níveis de DHL situavam-se no intervalo de 40 a 618 U.I./L. Os mesmos testes foram realizados em paralelo com uma metodologia de referência. A comparação do kit Deidrogenase Láctica Doles (Y) com a metodologia acima mencionada (X) deu origem à seguinte equação de regressão linear: $Y = 3,49 + 1,002X$, sendo o coeficiente de correlação 0,997.

Testes de recuperação mostram que a mesma situa-se entre 96 e 104%.

O erro da média foi de 2,24%.

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

	Amostra 1	Amostra 2
Concentração (U.I./L)	219,00	522,10
Desvio padrão	7,68	12,01
Coefficiente de variação (%)	3,50	2,30

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

	Amostra 1	Amostra 2
Concentração (U.I./L)	219,65	501,25
Desvio padrão	10,04	20,17
Coefficiente de variação (%)	4,60	4,10

Especificidade: os estudos da técnica de Whitaker apresentam boa correlação com as técnicas espectrofotométricas de Amador (37°C) e Henry (25°C). A técnica de Whitaker é específica para determinação da DHL, contudo, os fatores tempo e temperatura são decisivos para uma boa reprodutibilidade da metodologia. A queda de 1°C na temperatura do banho maria condiciona uma diminuição de 7% na atividade do DHL. Um erro de 30 segundos leva a uma alteração de 10% na dosagem.

Sensibilidade: a absorvância encontrada, de 0,004, corresponde a 2 U.I./L de concentração de DHL, quando realizados em espectrofotômetro, a 510nm. A sensibilidade do sistema está diretamente relacionada com a do aparelho utilizado no laboratório. Na presente técnica, uma unidade internacional (U.I./L) de DHL corresponde à formação de 1µmol de NADH por litro de soro por minuto, a 37°C.

Diluição da matriz: estudos sucessivos de diluição da matriz mostraram que não há interferência na sensibilidade diagnóstica da presente metodologia de Whitaker modificado.

Substâncias interferentes: amostras hemolizadas não devem ser utilizadas, pois as hemácias são ricas em DHL. Certas drogas interferem nos níveis de DHL. Para controle de tal interferência, recomenda-se que o paciente seja questionado quanto a uso de medicamentos.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Whitaker, J.F.: *Clin. chim. acta*, 24; 1969, 23-27.
- Doles, J.: *Método simples, cinético para dosagem da deidrogenase láctica*. VII Congresso Brasileiro de Patologia Clínica. Curitiba, 1972.
- Ravel R. Laboratório Clínico, *Aplicações clínicas dos achados laboratoriais*, 4ª ed; 183-185; 1988.
- Pagana K.D.: *Mosby's diagnostic and laboratory test reference*, 450-451; 1993.
- 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 10231810022

Revisão: 13 (08/2009)

NBR ISO 9001

Sistema da Qualidade certificado desde 1999

