

## Finalidade

Método UV otimizado 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. Por ser uma enzima intracelular, sua elevação é indicio de dano tissular com a consequente liberação da enzima à circulação.

Valores elevados são encontrados na proliferação de células neoplásicas, doenças cardiorrespiratórias com hipoxemia, anemias hemolíticas, hepatite, infarto renal, pancreatite aguda, destruição excessiva de células, fraturas, obstrução intestinal.

## Fundamento 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:** solução de tampão Tris pH 7,2 contendo piruvato e cloreto de sódio.

**B. Reagente B:** solução contendo NADH.

**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

**Reagentes Fornecidos:** prontos para uso. Podem ser utilizados separadamente ou como Reagente único, misturando 4 partes de Reagente A com 1 parte de Reagente B (ex.: 4 ml Reagente A + 1 ml Reagente B).

## Precauções

Os reagentes são para uso diagnóstico *in vitro* veterinário.

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

Todos os reagentes e as amostras devem ser descartados conforme a regulação local vigente.

## Estabilidade e instruções de armazenamento

**Reagentes Fornecidos:** são estáveis sob refrigeração (2-8°C) até a data de vencimento indicada na embalagem. Uma vez abertos, não devem permanecer destampados nem fora do refrigerador por períodos prolongados. Evitar contaminações.

**Reagente único (pré-misturado):** é estável um mês sob refrigeração (2-8°C), a partir do momento de sua preparação.

## Indícios de instabilidade ou deterioração dos reagentes

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

## Amostra

Soro ou plasma.

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

## Interferências

Não são observadas interferências por triglicérides até 570 mg/dl, bilirrubina até 18 mg/dl, hemoglobina até 180 mg/dl (em amostras com níveis normais de LDH) ou até 350 mg/dl (em amostras com níveis elevados de LDH), nem heparina até 50 UI/ml.

Referência bibliográfica de Young para efeitos de drogas neste método.

## 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 da reação

(Diminuição de absorvância)

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

- Temperatura da reação: 37°C.

- 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

### I - Técnica com reagente único

Em uma cubeta mantida a 37°C, colocar:

|   |        |
|---|--------|
| Reagente único                              | 1,0 ml |
| Pré-incubar uns minutos. Após, acrescentar: |        |
| Amostra                                     | 20 µL  |

Misturar imediatamente e disparar simultaneamente o cronômetro. Esperar 30 segundos. Ler a absorvância inicial (vide "Limitações do procedimento") e após aos 1, 2 e 3 minutos da primeira leitura. Determinar a diferença média da absorvância/min ( $\Delta A/\text{min}$ ), subtraindo cada leitura da anterior e tirando a média dos valores. Utilizar esta média para os cálculos.

### II - Técnica com reagentes separados

Em uma cuba mantida a 37°C, colocar:

|   |         |
|---|---------|
| Reagente A                                  | 1,0 ml  |
| Amostra                                     | 20 µL   |
| Pré-incubar uns minutos. Após, acrescentar: |         |
| Reagente B                                  | 0,25 ml |

Misturar imediatamente e disparar simultaneamente o cronômetro. Esperar 30 segundos. Ler a absorvância inicial (vide "Limitações do procedimento") e após aos 1, 2 e 3 minutos da primeira leitura. Determinar a diferença média da absorvância/min ( $\Delta A/\text{min}$ ), subtraindo cada leitura da anterior e tirando a média dos valores. Utilizar esta média para os cálculos.

## Cálculo 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 (com Reagente único ou separados) como se indica na seguinte tabela de fatores:

### Técnica com reagente único

| Long. De Onda | Fator a 37°C |
|---------------|--------------|
| 340 nm        | 8095         |
| 334 nm        | 8253         |
| 366 nm        | 15000        |

### Técnica com reagentes separados

| Long. De Onda | Fator a 37°C |
|---------------|--------------|
| 340 nm        | 10080        |
| 334 nm        | 10275        |
| 366 nm        | 18675        |

Exemplo:

(Os dados apresentados a seguir são ilustrativos)

|                | Amostra | Diferença | Média |
|----------------|---------|-----------|-------|
| Absorvância A1 | 1,582   |           |       |
| Absorvância A2 | 1,503   | 0,079     |       |
| Absorvância A3 | 1,425   | 0,078     |       |
| Absorvância A4 | 1,347   | 0,078     | 0,078 |

Utilizando Fator teórico (37°C):

LDH (U/L) = 0,049 x 8095 = 396 U/L

Se for utilizado Laborcal **Vet** como calibrador:

Concentração de LDH no calibrador: 526 U/L (37°C)

|                | Calibrador | Diferença | Média |
|----------------|------------|-----------|-------|
| Absorbância A1 | 1,528      |           |       |
| Absorbância A2 | 1,462      | 0,066     |       |
| Absorbância A3 | 1,397      | 0,065     |       |
| Absorbância A4 | 1,332      | 0,065     | 0,065 |

Obtenção do fator de calibração:

$$\text{Fator} = \frac{[\text{LDH}_{\text{calibrador}}]}{\Delta A/\text{min}_{\text{calibrador}}} = \frac{526 \text{ U/L}}{0,065} = 8092$$

$$\text{LDH (U/L)} = \Delta A/\text{min}_{\text{amostra}} \times \text{Fator} = 0,078 \times 8092 = 631 \text{ U/L}$$

#### Valores de Referência

##### Espécie (U/L)

|        |            |
|--------|------------|
| Canina | 45 – 233   |
| Felina | 63 – 273   |
| Bovino | 692 – 1445 |
| Equina | 162 – 412  |

Os valores de referência devem ser usados apenas como orientação. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça, na população de animais atendida, 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 (Laborcontrol **Vet** 1 e 2) com atividades conhecidas de lactato desidrogenase, com cada determinação.

#### Limitações do procedimento

Ver "Interferências".

Absorbância inicial baixa: uma vez adicionado o soro, se a primeira leitura (tempo 0) for inferior a 0,800 D.O., estando o Reagente B 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.

#### Desempenho

- a) Reprodutibilidade: processando 20 determinações simultaneamente de uma amostra canina e outra equina com valores dentro do intervalo de referência, obteve-se o seguinte:

Amostra Canina:

| Concentração | D.P. | C.V. |
|--------------|------|------|
| 1934,80      | 7,47 | 0,39 |
| 284,40       | 2,68 | 0,94 |

Amostra Equina:

| Concentração | D.P. | C.V. |
|--------------|------|------|
| 408,35       | 2,83 | 0,69 |
| 747,30       | 5,98 | 0,80 |

- b) **Linearidade:** o limite de linearidade é até 1000 U/L. Se o  $\Delta A/\text{min}$  for superior a 0,120 D.O. (340-334 nm a 37°C), repetir a determinação com a amostra diluída 1/5 ou 1/10 com solução fisiológica, corrigindo consequentemente os resultados.
- c) **Limite de quantificação:** a mínima atividade quantificável de lactato desidrogenase é 24 U/L.

#### Parâmetros para analisadores automáticos

Para a programação consultar o manual de uso do analisador a ser utilizado.

#### Apresentação

2 x 48 mL **Reagente A**

2 x 12 mL **Reagente B**

(Cód. 1774214)

#### Referências

- 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.

- Thrall, M. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária 2 ed. Guanabara koogan: Rio de Janeiro, 2015.

- González, F. H. D.; SILVA, S. C. Introdução a bioquímica clínica veterinária. Porto Alegre: UFRGS, 2003.

#### Termo de garantia

Este Kit como um todo tem garantia de troca, desde que esteja dentro do prazo de validade e seja comprovado pelo Departamento Técnico da Laborlab Produtos para Laboratórios Ltda. que não houve falhas técnicas na execução e manuseio deste kit, assim como em sua conservação.

#### SÍMBOLOS



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



Representante autorizado na Comunidade Européia



Uso médico-diagnóstico "in vitro"



Conteúdo suficiente para <n> testes



Data de validade



Limite de temperatura (conservar a)



Não congelar



Risco biológico



Volume após da reconstituição



Conteúdo



Número de lote



Elaborado por:



Nocivo



Corrosivo / Caústico



Irritante



Consultar as instruções de uso



Calibrador



Controle



Controle Positivo



Controle Negativo



Número de catálogo



Laborlab Produtos para Laboratórios Ltda.

Estrada do Capão Bonito, 489

Guarulhos/SP – Brasil – CEP: 07263-010

CNPJ: 72.807.043/0001-94

Atendimento ao cliente:

+55(11) 2480-0529/+55(11) 2499-1277

[sac@laborlab.com.br](mailto:sac@laborlab.com.br)

[www.laborlab.com.br](http://www.laborlab.com.br)

Revisão 00

Setembro/2020