

## FINALIDADE

Sistema para determinação enzimática do colesterol total no soro, plasma e outros líquidos biológicos.

**Somente para uso diagnóstico *in vitro*.**

## PRINCÍPIO

O colesterol no soro é quantificado através das seguintes reações enzimáticas:

1. Ésteres de colesterol  $\xrightarrow{\text{col. esterase}}$  colesterol livre + ácidos graxos
2. Colesterol + O<sub>2</sub>  $\xrightarrow{\text{col. oxidase}}$  colesterona + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
Livre
3. 2H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 4 Aminoantipirina + p-Hidroxibenzoato  $\xrightarrow{\text{Peroxidase}}$   
→ 4-Antipirilquinonimina + 4 H<sub>2</sub>O

O produto formado pela oxidação da 4-Aminoantipirina (4-Antipirilquinonimina) é de coloração avermelhada e sua intensidade, diretamente proporcional à concentração de colesterol no soro. A cor vermelha, formada pela reação, é medida em espectrofotômetro ou fotocolorímetro, com absorção máxima em **510nm**.

## PARTICULARIDADES DO SISTEMA

Os métodos de eleição para dosagem do colesterol são os enzimáticos nos quais as interferências são praticamente nulas. O reagente **Doles** para dosagem enzimática do colesterol apresenta-se em pó e sua reconstituição é feita pela adição do conteúdo de um frasco a 65mL de água. Ausência de fenol (cáustico) no reagente estende a sua estabilidade.

## REAGENTES

**Tampão/enzima:** cada frasco contém 1,12g de tampão enzima em pó.

**Surfactante:** solução de Triton X-100.

**Solução padrão 200mg/dL:** solução aquosa estabilizada de colesterol.

## APRESENTAÇÃO

Tampão / enzimas	4 x 1,12g
Surfactante	1 x 3 mL
Solução padrão 200mg/dL	1 x 3 mL

## NÚMERO DE TESTES

Manual - 130 testes (20 µL amostra/2mL Reagente de Cor)  
260 testes (10 µL amostra/1mL Reagente de Cor)  
Automático - 700 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 ou fotocolorímetro capaz de medir a absorvância em 510nm ou filtro verde.
- Tubos de ensaio.
- Pipetas graduadas.
- Pipetas semiautomáticas 20 µL.
- Ponteiras descartáveis.
- Água deionizada ou destilada.
- Banho maria (37°C).
- Cronômetro.
- Frasco âmbar com capacidade volumétrica para 65mL.
- Proveta com capacidade de 65mL.

## ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

**Tampão/enzima:** armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável na forma liofilizada até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, obedecidas as condições de armazenamento.

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

**Solução padrão 200mg/dL:** armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, obedecidas as condições de armazenamento.

**Reagente de uso:** armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável por 45 dias após a reconstituição, obedecidas as condições de uso.

## 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:



Irritante

## AMOSTRA

Soro ou plasma (heparina) isentos de hemólise. Após jejum de 12 a 16 horas, o sangue é colhido com o mínimo de estase possível. O soro ou plasma devem ser separados, no máximo, duas horas após a coleta. Quando refrigerada (2-8°C), a amostra se conserva por 7 dias. Se mantida a 10°C negativos, conserva-se por 3 meses. O uso de anticoagulantes como: citrato, EDTA e oxalato, provoca resultados ligeiramente diminuídos.

**Todas as amostras biológicas devem ser consideradas como potencialmente infectantes.**

## PROCEDIMENTO TÉCNICO

### Preparo do reagente para uso:

Em um frasco limpo, cor âmbar, adicionar **65mL de água destilada** e todo pó de um frasco **tampão/enzimas**. Agitar levemente por inversão até dissolver o pó e em seguida acrescentar **5 gotas do surfactante**. O reagente de uso, após o preparo, permanece estável por cerca de 45 dias sob refrigeração.

Identificar 3 tubos de ensaio com **B (branco), T (teste) e P (padrão)**.

Proceder como segue:

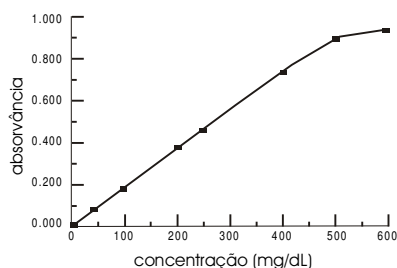
	B	T	P
<b>Reagente de cor</b>	2,0mL	2,0mL	2,0mL
<b>Solução padrão</b>	-	-	20 µL
<b>Amostra</b>	-	20 µL	-

Misturar por agitação e incubar por 10 minutos, em banho maria, a 37°C.

Retirar do banho maria e ler as absorvâncias em espectrofotômetro ou fotocolorímetro, entre 490 a 510nm, zerando o aparelho com o **branco**. A cor desenvolvida permanece estável por 60 minutos.



## CURVA DE CALIBRAÇÃO



Padrão	Absorvância	Conc. (mg/dL)
1	0.000	0
2	0.180	100
3	0.360	200
4	0.452	250
5	0.722	400
6	0.895	500
7	0.930	600

**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.

• **A reação é linear entre 0 e 500mg/dL (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 Colesterol 250 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 abaixo.**

• **O fator deverá ser feito periodicamente e a cada lote do produto.**

• Os padrões utilizados na montagem da curva de calibração foram rastreados contra "Cholesterol Calibrator, cat. N° C 7921 de Sigma Chemical Company" e certificado por CDC e NCEP.

## CÁLCULOS

$$\text{Cholesterol (mg/dL)} = \frac{\text{absorvância teste}}{\text{absorvância padrão}} \times 200$$

**Exemplo:**

Leitura:

Padrão: 0,360

Teste: 0,280

$$\text{Cholesterol (mg/dL)} = \frac{0,280}{0,360} \times 200 = 155,5 \text{ mg/dL}$$

Como a reação corada segue estritamente a lei de Beer, basta que se determine um **fator (F)** para cálculo dos resultados.

$$\text{Fator (F)} = \frac{200}{\text{absorvância padrão}}$$

$$\text{Cholesterol (mg/dL)} = \text{absorvância teste} \times F$$

Para a determinação do fator, recomenda-se dosar em triplicata o padrão, ler as absorvâncias e tirar a média aritmética das mesmas.

**Exemplo:**

Leitura:

Padrão: 0,360; 0,359; 0,361

$$\text{Média aritmética} = \frac{0,360 + 0,359 + 0,361}{3} = 0,360$$

$$\text{Fator (F)} = \frac{200}{0,360} = 555,55$$

Leitura do teste: 0,280

$$\text{Cholesterol (mg/dL)} = 0,280 \times 555,55 = 155,55$$

## EXPRESSÃO DOS RESULTADOS EM UNIDADE S.I.

$$\text{Cholesterol mmol/L} = \text{cholesterol mg/dL} \times 0,02586$$

## 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.

• Algumas drogas como: os adrenocorticotrópicos (ACTH), esteroides anabolizantes, bloqueadores beta adrenérgicos, corticosteroides, epinefrina, contraceptivos orais, fenitoína, sulfonamidas, diuréticos tiazídicos, podem elevar os níveis de colesterol.

• Algumas drogas como: alopurinol, andrógenos, captropril, clorofibrato, colchicina, eritromicina, isoniazida, lovastatina, inibidores da MAO, neomicina, niaciacina e nitratos, podem reduzir os níveis de colesterol.

## CONTROLE DE 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, aminas 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 e a temperatura (37°C), 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.

Em termos estatísticos, na população brasileira adulta, em ambos os sexos, os níveis de colesterol situam-se na faixa de 150 - 240mg/dL.

O colesterol e suas frações são componentes lipídicos de maior importância na evolução do quadro de aterogênese. Estudos mostram relação entre o aumento da incidência de doença coronária isquêmica (DCI) e o aumento da taxa de colesterol sanguíneo, determinando então os grupos de risco.

Como referência, dá-se valor não ao dado estatístico, mas sim aos níveis de colesterol sérico que definam prognósticos:

	Cholesterol mg/dL
Desejável	< 200
Limítrofe	200 - 239
Alto risco (DCI)	> 240



## SIGNIFICADO CLÍNICO

Aterosclerose é um fenômeno degenerativo que compromete as artérias de grande e médio calibre de nosso organismo. Inicia-se precocemente, tendo papel importante na sua evolução, determinados fatores raciais e principalmente, alimentares. Sua expressão anatômica é a diminuição da luz vascular, com sérias consequências quando as lesões se localizam nas artérias cerebrais ou coronarianas. Grande quantidade de lipídeos, com predominância de colesterol, estão presentes nas lesões.

Estudos de Framingham mostram uma correlação direta entre os níveis sanguíneos de colesterol e as lesões ateroscleróticas. O colesterol tem papel importante na patogênese da *doença coronariana isquêmica* (DCI). O "National Cholesterol Education Program"(NCEP) advoga os seguintes valores referenciais para o colesterol sanguíneo em adultos com mais de 20 anos:

	Desejável	Limítrofe	Alto risco/DCI
Colesterol (mg/dL)	< 200	200-239	> 240

Aumentos secundários do colesterol são encontrados em: hipotireoidismo, diabetes não controlada, síndrome nefrótica (glomerulonefrite crônica membranosa) e cirrose biliar. Por vezes, ocorrem aumentos discretos na gravidez.

Hipocolesterolemia pode ser detectada nos estados de desnutrição, hipertireoidismo, anemia perniciosa e doenças hepáticas que evoluam com quadro de insuficiência funcional do órgão.

## CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Foram realizados 42 testes em amostras cujos teores de colesterol situavam-se no intervalo de 115 a 418mg/dL. Esses ensaios foram realizados em paralelo com uma metodologia de referência. A comparação do kit de Colesterol 250 Doles (Y) com a metodologia mencionada (X) deu origem à seguinte equação de regressão linear:  $Y = 7,36 + 0,979X$ , sendo o coeficiente de correlação 0,98.

Testes mostram uma recuperação de  $99 \pm 2,5\%$ .

O erro da média foi de 1,08%.

**Repetitividade:** foram realizadas 20 dosagens sucessivas, com 3 amostras, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração (mg/dL)	110,39	210,35	381,32
Desvio padrão	1,52	2,02	4,37
Coefficiente de Variação (%)	1,38	0,96	1,15

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

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração (mg/dL)	112,24	223,56	360,36
Desvio padrão	1,81	2,48	4,06
Coefficiente de Variação (%)	1,61	1,11	1,13

**Especificidade:** a presente metodologia é mais específica que os métodos químicos, estando sujeita a raras substâncias interferentes, pois a colesterol oxidase pode reagir com outros esteróis. Os métodos enzimáticos são métodos de referência e de primeira escolha para determinação do colesterol total, com boa precisão e coeficientes de variação entre 1% e 2%.

**Sensibilidade:** a absorvância encontrada, de 0,002, corresponde a 1,0mg/dL de concentração de colesterol, quando medida em espectrofotômetro, em 510nm. A sensibilidade do sistema está diretamente relacionada com a do aparelho utilizado no laboratório.

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

**Substâncias interferentes:** substâncias redutoras, como Ácido Ascórbico e Bilirrubina, podem interferir na determinação do colesterol, pois os mesmos consomem o peróxido de hidrogênio, produzindo resultados falsos. A Bilirrubina interfere quando presente em concentrações superiores a 5mg/dL, podendo haver um decréscimo de 5% do valor do colesterol. Amostras turvas, que contenham triglicérides elevados, podem interferir com a presente metodologia. A presença de Ácido Úrico em concentrações anormalmente elevadas, não interferem na determinação do colesterol total pelo método enzimático.

## BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Trinder. P.: Ann: *Clin.biochem.*, 6,24; 1969.
- D.Braham e P. Trinder: *Analyst* 97; 1972.
- Allain,C.C.; Poon, L.S.: *Clin. chem.* 20:470; 1974.
- Pesce, A.J.; Kaplan, L.A.: *Methods clinical chemistry*, 1156-1178, 1987.
- Pagana K.D.: *Mosby's diagnostic and laboratory test reference*, 190-192, 1992.
- Cockayne, S; Anderson S.C.: *Clinical chemistry: concepts and applications*, 173 - 174, 1993.
- Tibúrcio, H.M.: *Controle interno da qualidade analítica*, 1ªed. março/1995.
- Henry, J.B.: *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*, 19ª ed, 214-215, 1996.
- 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 10231810004

Revisão: 18 (08/2009)

## NBR ISO 9001

**Sistema da Qualidade certificado desde 1999**

