

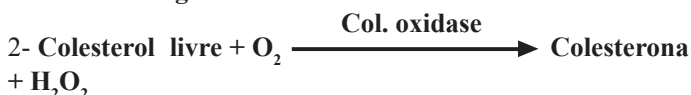
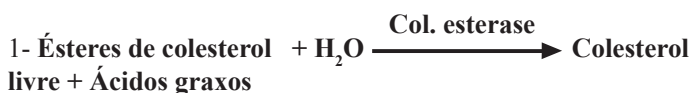
FINALIDADE

Sistema para determinação enzimática do colesterol total no soro ou plasma.

Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO

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



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** ou **filtro verde**.

REAGENTES

Reagente de Cor: Solução tampão de Pipes 35mmol/L, pH 7,0, contendo Colato de sódio 0,5mmol/L, 4-Aminoantipirina 0,5mmol/L, Colesterol Esterase $\geq 300\text{U}$, Colesterol Oxidase $\geq 204\text{U}$ e Peroxidase $\geq 828\text{U}$.

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

APRESENTAÇÃO

Colesterol Enzimático Líquido 200

Reagente de cor 2 x 100mL
Solução padrão 200mg/dL 1 x 3mL

Colesterol Enzimático Líquido 500

Reagente de cor 2 x 250mL
Solução padrão 200mg/dL 1 x 3mL

NÚMERO DE TESTES

Colesterol Enzimático Líquido 200

Manual 100 testes (20 μ L amostra/2mL Reag. de cor)
200 testes (10 μ L amostra/1mL Reag. de cor)

Automático (*) 800 testes

Colesterol Enzimático Líquido 500

Manual 250 testes (20 μ L amostra/2mL Reag. de cor)
500 testes (10 μ L amostra/2mL Reag. de cor)

Automático (*) 2000 testes

(*) A quantidade de testes na automação é variável de acordo com o equipamento.

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 10 μ L /20 μ L.
- Ponteiras descartáveis.
- Banho maria (37°C).
- Cronômetro.

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Reagente de Cor: armazenar à temperatura de 2-8°C, até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco. Ao longo do tempo, a solução pode adquirir tonalidade rósea, não interferindo nos resultados.

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

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 o contato com a pele e mucosas. Havendo contaminação acidental, lavar a área afetada em água corrente.

O descarte do material utilizado deverá ser feito obedecendo-se os critérios de biossegurança estabelecidos pelo laboratório, de acordo com as normas locais, estaduais ou federais.

O Reagente de Cor deve ser manipulado com cuidado, evitando a introdução de pipetas no mesmo. Pipetas contaminadas com detergentes podem levar à deterioração do mesmo.

Observar 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, devendo o soro ou plasma serem separados no máximo em duas horas após a coleta. Quando refrigerada (2-8°C), a amostra se conserva por 7 dias e 3 meses quando mantida a 10°C negativos.



Todas as amostras biológicas deverão ser consideradas como potencialmente infectantes.

PROCEDIMENTO TÉCNICO

O Reagente de cor está pronto para uso, e deve estar à temperatura ambiente no momento do uso.

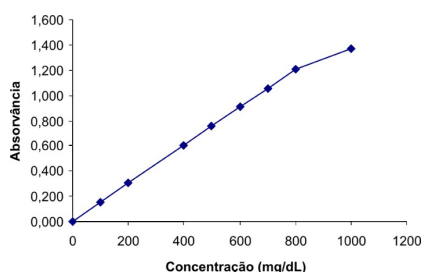
Identificar 3 tubos com **B(branco)**, **P(padrão)** e **T(teste)**.

Proceder como segue:

| | Branco | Padrão | Teste |
|-----------------|--------|--------|-------|
| Reagente de Cor | 2mL | 2mL | 2mL |
| Padrão | - | 20µL | - |
| Teste | - | - | 20µL |

Misturar por agitação e incubar durante 5 minutos em banho maria a 37°C ou 10 minutos à temperatura ambiente (20 – 30°C). Proceder à leitura das absorvâncias em espectrofotômetro ou fotocolorímetro entre **490 - 510nm**, zerando o aparelho com o branco. A cor desenvolvida permanece estável por 30 minutos à temperatura ambiente (20-30°C).

CURVA DE CALIBRAÇÃO



| Padrão | Absorvância | Conc. (mg/dL) |
|--------|-------------|---------------|
| 1 | 0 | -0 |
| 2 | 0,151 | 100 |
| 3 | 0,302 | 200 |
| 4 | 0,604 | 400 |
| 5 | 0,755 | 500 |
| 6 | 0,906 | 600 |
| 7 | 1,057 | 700 |
| 8 | 1,208 | 800 |
| 9 | 1,370 | 1000 |

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

- A curva de calibração é constituída pela relação gráfica dos valores das absorvâncias com os valores das concentrações, de um conjunto de soluções padrão.
- A curva de calibração demonstra a linearidade da reação até uma concentração de 800mg/dL
- **A reação é linear até 800mg/dL (ver curva acima). Para valores acima, diluir a amostra com solução fisiológica e proceder a nova dosagem. Multiplicar o valor encontrado pelo fator de diluição.**
- **O cálculo da concentração do Colesterol sérico pode ser feito utilizando-se de um**

Fator (F), desde que o valor encontrado seja inferior a 800mg/dL.

- O kit de Colesterol Enzimático Líquido 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 (F) de acordo com o exemplo mostrado abaixo.
- O fator deverá ser refeito periodicamente e a cada lote do produto.
- Os padrões utilizados na montagem da curva de calibração são uma solução aquosa de Colesterol cujas concentrações variam entre 100 e 1000mg/dL. Os mesmos foram rastreados frente a ***Cholesterol in Human Serum – Standard Reference Material 1952 a – NIST/CAP.***

CÁLCULOS

$$\text{Colesterol (mg/dL)} = \frac{\text{Absorvância Teste}}{\text{Absorvância Padrão}} \times 200$$

Exemplo:

Leituras:

Padrão : 0,305

Teste : 0,160

$$\text{Colesterol (mg/dL)} = \frac{0,160}{0,305} \times 200 = 105\text{mg/dL}$$

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

$$\text{Fator} = \frac{200}{\text{Absorvância}}$$

$$\text{Colesterol (mg/dL)} = \text{absorvância Teste} \times \text{F}$$

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

Exemplo:

Leituras:

Padrão : 0,305, 0,304, 0,306

$$\text{Média aritmética} = \frac{0,304 + 0,305 + 0,305}{3} = 0,305$$

$$\text{Fator} = \frac{200}{0,305}$$

Fator = 655

Leitura do teste = 0,160

$$\text{Colesterol (mg/dL)} = 0,160 \times 655,7 = 104,9\text{mg/dL}$$



EXPRESSIONÃO DOS RESULTADOS EM UNIDADE S.I.

Colesterol (mmol/L) = colesterol (mg/dL) x 0,02586

LIMITAÇÕES DO SISTEMA

- Para se obter ótimo desempenho do sistema, é necessário que o procedimento técnico seja rigorosamente seguido conforme explicitado na instrução de uso. Alterações no procedimento técnico podem levar a resultados errôneos.
- Algumas drogas podem elevar os níveis de colesterol, incluindo entre elas: os adrenocorticotrópicos (ACTH), esteroides anabolizantes, bloqueadores beta adrenérgicos, corticosteroides, epinefrina, contraceptivos orais, fenitoína, sulfonamidas, diuréticos tiazídicos.
- Algumas drogas podem reduzir os níveis de colesterol. Entre elas estão: alopurinol, andrógenos, captopril, clorofibrato, colchicina, eritromicina, isoniazida, lovastatina, inibidores da MAO, neomicina, niaciacina e nitratos.

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 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, na população atendida, sua própria faixa de valores de referência.

Em termos estatísticos, na população brasileira adulta, ambos 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, conceituando-se então os grupos de risco.

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

Colesterol 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 e na sua evolução tem papel importante fatores raciais e principalmente alimentares. Sua expressão anatômica é a diminuição da luz vascular com sérias consequências quando as lesões se localizam ao nível das artérias cerebrais ou coronarianas. Grande quantidade de lipídeos com predominância de colesterol estão presentes ao nível das lesões.

Estudos de Framingham mostram uma correlação direta entre os níveis sanguíneos de colesterol e lesões ateroscleróticas.

Na patogenese da "Doença coronariana isquêmica" (DCI), tem papel importante o colesterol. O "National Cholesterol Education Program"(NCEP) advoga os seguintes valores referenciais para 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 no hipotireoidismo, diabete não controlada, síndrome nefrótica (glomerulonefrite crônica membranosa), cirrose biliar e por vezes 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 DO DESEMPENHO

Foram realizados 40 dosagens em amostras cujo teor de colesterol se situava no intervalo de 119,9 a 468mg/dL. Estes ensaios foram realizados em paralelo com um produto de referência. A comparação do kit de Colesterol Líquido Doles (Y) com o produto de referência (X), deu origem à seguinte equação de regressão linear: $Y = 21,75 + 0,89X$, sendo o coeficiente de correlação (r) = 0,96.

Testes mostram uma recuperação de 99 +- 1,6%.



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

| | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Concentração (mg/dL) | 97,64 | 196,78 | 408,32 |
| Desvio Padrão | 1,05 | 2,05 | 4,09 |
| Coefficiente de Variação (%) | 1,08 | 1,04 | 1,00 |

Reprodutibilidade: foram realizadas 20 dosagens durante 20 dias consecutivos em 3 amostras obtendo-se os seguintes resultados:

| | Amostra 1 | Amostra 2 | Amostra 3 |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Concentração (mg/dL) | 117,64 | 208,33 | 345,05 |
| Desvio Padrão | 1,58 | 2,55 | 3,86 |
| Coefficiente de Variação (%) | 1,34 | 1,22 | 1,12 |

Especificidade: a presente metodologia é específica para a dosagem do colesterol total. Os métodos enzimáticos são métodos de referência e de primeira escolha para determinação do colesterol total, com boa precisão.

Sensibilidade: a absorvância encontrada de 0,002 corresponde a, aproximadamente, 1mg/dL de concentração de colesterol, quando a leitura é realizada em espectrofotômetro com banda espectral inferior a 7nm, passagem de luz de 10mm, em 510nm. A sensibilidade do sistema está estritamente relacionada com a sensibilidade 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.

Substâncias interferentes: substâncias redutoras como o 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 15mg/dL, podendo haver um decréscimo de 5% do valor do colesterol. Amostras turvas que contenham triglicérides elevados, pode interferir com a presente metodologia. A presença de ácido úrico em concentrações anormais elevadas não interfere 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.
- Henry, J.B.; Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 19ª ed, 214-215, 1996.
- Cockayne, S; Anderson S.C; Clinical Chemistry: Concepts and Applications, 173 - 174, 1993.
- Pesce, A.J.; Kaplan, L.A.; Methods Clinical Chemistry, 1156-1178, 1987.
- 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.

Os reagentes que compõem este sistema para diagnóstico são garantidos na sua performance, reprodutibilidade e qualidade até a data de vencimento.

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

Doles Reag. Equip. para Laboratórios Ltda.
CNPJ: 01.085.513/0001-05
Rodovia BR 153, Km 493, Lt.07
Conjunto Palmares.
CEP: 74775-027
Goiânia - GO - Brasil
e-mail: doles@doles.com.br

M.S.: nº 10231810076

Revisão: 17 (04/2010)

NBR ISO 9001

Sistema da Qualidade
certificado desde 1999

