

FINALIDADE

Sistema para determinação do Colesterol HDL no soro.
Somente para uso diagnóstico in vitro.

PRINCÍPIO

Lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e muito baixa densidade (VLDL), são precipitadas seletivamente por polietilenoglicol tamponado (PEG 6000). No sobrenadante resta apenas a fração de alta densidade (HDL). O teor de colesterol da fração HDL é determinado pelo sistema enzimático Colesterol 250 Doles/Colesterol Enzimático Líquido Doles.

PARTICULARIDADES DO SISTEMA

As técnicas para dosagens do Colesterol HDL baseiam-se na precipitação seletiva das frações LDL e VLDL. Como agentes precipitantes são utilizados: Heparina, Fosfotungstato, Sulfato de Dextran e Polietilenoglicol, em combinação com íons Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} .

Doles Reagentes apresenta um reagente precipitante único, estável, representado por uma solução de Polietilenoglicol 6000 tamponado a pH 10.

Nas condições de uso do reagente, a precipitação é altamente seletiva e o sobrenadante límpido. A "flutuação" de precipitados é praticamente inexistente em soros com teor de triglicérides até 800mg/dL.

METODOLOGIA

PEG 6000 modificado.

REAGENTES

Reagente precipitante: solução 20% de Polietilenoglicol 6000 (PEG 6000), tamponado a pH 10.

Solução padrão 50mg/dL: solução aquosa, estabilizada, de colesterol.

APRESENTAÇÃO

Reagente precipitante 1 x 20mL
Solução padrão 50mg/dL 1 x 03mL

NÚMERO DE TESTES

100 testes 200µL de soro

EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

- Espectrofotômetro ou fotocolorímetro capaz de medir a absorvância em **510nm** ou **filtro verde**.
- Centrífuga.
- Tubos para centrífuga.
- Pipetas graduadas.
- Pipetas semiautomáticas 50µL e 100µL.
- Ponteiras descartáveis.
- Banho maria (37°C).
- Cronômetro.
- Reagente de cor **Colesterol 250 Doles/Colesterol Enzimático Líquido Doles**.

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Reagente precipitante: 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 50mg/dL: armazenar à temperatura de 2-8°C, bem vedado, para evitar evaporação. 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 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. Estável por 4 dias sob refrigeração (2-8°C). Após a precipitação, o sobrenadante permanece estável por 15 dias se mantido a 20°C negativos. Não usar amostras com muita hemólise. O paciente deve estar em jejum obrigatório de 12hs. **Todas as amostras biológicas devem ser consideradas como potencialmente infectantes.**

PROCEDIMENTO TÉCNICO

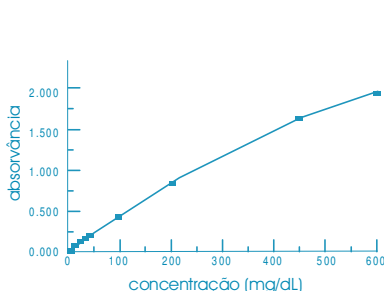
1. Em tubo 10x75, adicionar **200µL de soro** e **200µL de reagente precipitante**. Homogeneizar e deixar repousar por 10 minutos à temperatura ambiente.
2. Centrifugar durante 15 minutos a 3.500 rpm ou 4 minutos a 12.000 rpm.
3. Utilizar **Reagente de Cor dos Kits: Colesterol 250 Doles ou Colesterol Enzimático Líquido Doles**. Identificar 3 tubos de ensaio com **B (branco)**, **T (teste)** e **P (padrão)**.

Proceder como segue:

	B	T	P
Reag. de cor	2,0mL	2,0mL	2,0mL
Solução padrão	-	-	50µL
Sobrenadante	-	50µL	-

Misturar por agitação e incubar por **10 minutos**, em banho maria, a 37°C. Retirar do banho maria e efetuar as leituras das absorvâncias de **P** e **T** em espectrofotômetro ou fotocolorímetro, entre **490 a 510nm**, zerando o aparelho com o **branco**. A cor final desenvolvida permanece estável por 30 minutos.

CURVA DE CALIBRAÇÃO



Padrão	Absorvância	Conc. (mg/dL)
1	0.000	0
2	0.038	10
3	0.076	20
4	0.114	30
5	0.190	50
6	0.380	100
7	0.760	200
8	1.650	450
9	1.950	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 até 400mg/dL (ver curva acima).**
- **O kit de Colesterol HDL 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, tendo como referência "Cholesterol Calibrador 50mg/dL, cat.nº C 9908 - Sigma Chemical Company".

CÁLCULO

No item 1 do procedimento técnico, o soro é diluído 1:2 com o reagente precipitante. Na fórmula de cálculo, o resultado encontrado já é multiplicado por 2 para se ter o resultado final. No cálculo do fator (F), surge o número 100 derivado de 50×2 .

$$\text{Cholesterol HDL (mg/dL)} = \frac{\text{absorvância teste}}{\text{absorvância padrão}} \times 50 \times 2$$

Exemplo:

Leituras:

Teste (T): 0,100

Padrão (P): 0,190

$$\text{Cholesterol HDL (mg/dL)} = \frac{0,100}{0,190} \times 50 \times 2 = 52,6$$

Como a reação corada segue a Lei de Beer, basta que se determine um fator (F) para cálculos dos resultados.

$$\text{Fator (F)} = \frac{100}{\text{absorvância padrão}}$$

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

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

Exemplo:

Leituras:

Padrão (P): 0,189; 0,190; 0,191

Teste (T): 0,100

$$\text{Média aritmética} = \frac{0,189 + 0,190 + 0,191}{3} = 0,190$$

$$\text{Fator (F)} = \frac{100}{0,190} = 526$$

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

$$\text{Cholesterol HDL (mg/dL)} = 0,100 \times 526 = 52,6$$

EXPRESSIONÃO DOS RESULTADOS EM UNIDADES S.I.

$$\text{Cholesterol HDL (mmol/L)} = \text{Cholesterol HDL (mg/dL)} \times 0,027$$

$$\text{Exemplo: colesterol HDL 45mg/dL} = 45 \times 0,027 = 1,215 \text{ mmol/L}$$

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.
- A relação entre amostra e precipitante (1:1) deve ser rigorosamente mantida.
- A velocidade e o tempo de centrifugação devem ser mantidos como explicitado nas instruções de uso.
- Após a centrifugação (item 2), se o sobrenadante apresentar-se turvo, deve-se diluir o soro 1:2 com solução fisiológica. Repetir os itens 1, 2 e 3 do procedimento técnico. O resultado encontrado deverá ser multiplicado pelo fator de diluição (2).

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 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.

Como orientação, sugerimos os seguintes valores:

Em relação às frações HDL, LDL e VDL do colesterol, valores desejáveis substituem aqueles de referência, criando-se o quadro abaixo:

Crianças e adolescentes		
Lípides	Valores (mg/dL)	Classificação
Cholesterol Total (idade 2 a 19 anos)	<170	Desejável
	170 a 199	Limítrofe
	≥200	Alto
Cholesterol LDL (idade 2 a 19 anos)	<110	Desejável
	110 a 199	Limítrofe
	≥130	Alto
Cholesterol HDL (<10 anos de idade)	≥40	Desejável
Cholesterol HDL (10 a 19 anos de idade)	≥35	Desejável
Adultos (maiores de 20 anos de idade)		
Lípides	Valores (mg/dL)	Classificação
Cholesterol Total	<200	Ótimo
	200 a 239	Limítrofe
	≥240	Alto
Cholesterol LDL	<100	Ótimo
	100 a 129	Desejável
	130 a 159	Limítrofe
	160 a 189	Alto
	≥190	Muito Alto
Cholesterol HDL	<40	Baixo
	>60	Alto (desejável)



COLESTEROL LDL E VLDL

As concentrações de colesterol LDL e VLDL podem ser calculadas segundo Friedwald, desde que respeitadas os seguintes itens:

1. Triglicérides sérico inferior a 400mg/dL.
2. O paciente não é portador de dislipidemia tipo III.

$$\text{Colesterol VLDL} = \frac{\text{triglicérides}}{5}$$

$$\text{Colesterol LDL} = \text{colesterol total} - \text{colesterol (HDL + VLDL)}$$

SIGNIFICADO CLÍNICO

Desde a década de 60, sabe-se que nos indivíduos em que o nível de colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (Colesterol HDL) é baixo, a incidência de coronariopatias é mais elevada. Inversamente, os indivíduos com teores elevados de Colesterol HDL apresentam, estatisticamente, incidência menor de cardiopatias coronarianas. Tais fatores são explicados por pesquisas, as quais demonstram que as lipoproteínas de alta densidade (HDL) mobilizam o colesterol depositado ao nível da íntima das artérias, transportando-o para o fígado, onde será metabolizado.

Estudos epidemiológicos realizados em comunidades (destacam-se os estudos em Framingham) mostram relação direta entre níveis de colesterol total e doença coronariana isquêmica (DCI). Paralelamente, há relação inversa entre os níveis de colesterol HDL e DCI.

Através desses estudos epidemiológicos foram caracterizados os chamados **fatores de risco**:

1. História familiar de DCI prematuro (infarto do miocárdio ou morte súbita antes dos 55 anos em parentes próximos).
2. Fumante (consumo superior a 10 cigarros diários).
3. Hipertensão arterial.
4. Diabetes mellitus.
5. História de acidente vascular periférico ou doença vascular oclusiva periférica.
6. Obesidade severa (aumento de 30% ou mais no peso, em relação ao valor teórico).
7. Colesterol HDL inferior a 40mg/dL (repetidas dosagens).

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Foram realizados 45 testes em amostras cujos teores de colesterol HDL situavam-se no intervalo de 18 a 67mg/dL. Esses ensaios foram realizados em paralelo com uma metodologia de referência. A comparação do Colesterol HDL Doles (Y) com a metodologia mencionada (X) deu origem à seguinte equação de regressão linear: $Y=0,09 + 1,003X$, sendo o coeficiente de correlação 0,99.

Em oito amostras de soros, cujos valores oscilavam entre 20 e 51mg/dL de colesterol HDL, foram acrescentados 25mg de colesterol, havendo uma recuperação entre 97 e 102%.

O erro da média foi de 1,96%.

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

	Amostra 1	Amostra 2
Concentração (mg/dL)	27,93	52,07
Desvio padrão	1,05	1,13
Coefficiente de variação (%)	3,78	2,16

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

	Amostra 1	Amostra 2
Concentração (mg/dL)	30,21	54,98
Desvio padrão	1,35	1,38
Coefficiente de variação (%)	4,48	2,51

Especificidade: a presente metodologia é específica para precipitação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL e VLDL), restando no sobrenadante somente as lipoproteínas de alta densidade HDL.

Sensibilidade: a absorvância encontrada, de 0,004, corresponde a 1mg/dL de concentração de colesterol HDL, quando medida em espectrofotômetro, a 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 de PEG 6000.

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 5mg/dL. Nessa situação, pode haver um decréscimo de 5% a 15% do valor. Amostras turvas, que contenham triglicérides elevados (acima de 900mg/dL), podem interferir com a presente metodologia.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Vikani J. Scand J.: *Clin. lab. invest.* 36, 205-268, 1976.
- Castelli W.P. Doyle J.T. Gordon T. e cols.: *Circulation* 55, 762-772, 1977.
- Izzo C. Grisco F, Mirador E.: *Clin. chem.* 27, 371-374, 1981.
- Warnick G.R., Nguyen T. e Albers : *Clin.chem.* 31, 217-222, 1985.
- *Methods for clinical laboratory measurement of lipid and lipoprotein risk factors* - AACC Press, 1991.
- Pagana K.D.: *Morby's diagnostic and laboratory test reference*, 464-466, 1992.
- Tibúrcio, H.M.: *Controle interno da qualidade analítica*, 1ªed. março/1995.
- III Diretrizes Brasileiras sobre dislipidemias - Sociedade Brasileira de Cardiologia.
- 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 10231810012

Revisão: 17 (09/2009)

NBR ISO 9001

Sistema da Qualidade
certificado desde 1999

