

FINALIDADE

Sistema enzimático para determinação dos triglicérides no plasma ou soro. **Somente para uso diagnóstico in vitro.**

PRINCÍPIO

Os triglicérides no soro são quantificados através das seguintes reações enzimáticas:

1. Triglicérides $\xrightarrow{\text{Lipase}}$ glicerol + ácidos graxos.
2. Glicerol + ATP $\xrightarrow{\text{Glicerol quinase}}$ glicerol-3 -fosfato + ADP.
3. Glicerol-3-fosfato $\xrightarrow[\text{oxidase}]{\text{Glicerol fosfato}}$ dihidroxiacetona + H₂O₂
4. H₂O₂ + 4-clorofenol + 4-aminoantipirina $\xrightarrow{\text{Peroxidase}}$
→ 4- antipirilquinonimina + 4H₂O

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

PARTICULARIDADES DO SISTEMA

O sistema Triglicérides 120 **Doles** para dosagem enzimática dos triglicérides compõe-se de uma mistura enzimas/ATP, liofilizada em condições controladas de temperatura e umidade final residual. Prepara-se o reagente de uso pela simples diluição das enzimas na solução tampão já alíquotada. A solução tampão utilizada permite a estabilidade do reagente por até 30 dias, sob refrigeração (2-8°C).

REAGENTES

Tampão: Piperasine-N,N'-bis (2-etanosulfônico ácido) (PIPES) 50mmol/litro e pH 7,4, contendo ainda 1,25mmol de 4-Clorofenol.

Enzimas: cada frasco contém 3.600U de Lipase, 24U de Glicerolquinase, 90U de Glicerolfosfato Oxidase, 24U de Peroxidase, 0,024mmol de ATP e 0,018mmol de 4-Aminoantipirina.

Solução padrão 200mg/dL: solução de Glicerol estabilizado equivalente a 200mg/dL em termos de Trioleína.

APRESENTAÇÃO

Tampão	3 x 40mL
Enzimas (liofilizado)	3 x 80mg
Solução padrão 200mg/dL	1 x 3mL

NÚMERO DE TESTES

Manual	60 testes - 20µL amostra
	120 testes - 10µL amostra
Automático	500 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 as absorvâncias em 510nm ou filtro verde.
- Tubos de ensaio.
- Pipetas graduadas.
- Pipetas semiautomáticas de 20µL.
- Ponteiras descartáveis.
- Cronômetro.
- Banho maria (37°C).

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

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

Enzimas: 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 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.

Reagente de uso: a solução tampão/enzimas apresenta-se amarela clara ou ligeiramente rósea. Estável por 30 dias após o seu preparo, se mantida sob refrigeração (2-8°C). **Desprezar o reagente caso sua absorvância atinja 0,250.**

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. A solução tampão contém em sua fórmula: 4-Clorofenol (cáustico) e azida sódica. Em caso de contaminação acidental, lavar a parte 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, plasma (colhido com EDTA ou heparina) e outros líquidos biológicos. Os triglicérides permanecem estáveis na amostra nos 4 a 5 dias, sob refrigeração (2-8°C). Mantendo-se a amostra congelada (10°C negativos), a estabilidade se prolonga por 60 dias, devendo ser descongelada apenas uma vez. O sangue deve ser colhido após jejum de 12-14 horas. Coletas pós-prandiais mostram variações superiores a 100% sobre o triglicérides basal. Como o consumo de álcool provoca elevações nos teores dos triglicerídeos, recomenda-se sua não ingestão nas 24 horas antes da coleta. As amostras lipêmicas devem ser homogeneizadas antes da pipetagem.

Todas as amostras biológicas devem ser consideradas como potencialmente infectantes.

PROCEDIMENTO TÉCNICO

Preparo do reagente de uso:

Transferir parte da solução de um frasco tampão (± 7mL) para um frasco enzimas. Dissolver por inversão e retransferir para o frasco tampão. Homogeneizar por inversão. Após seu preparo, tem-se: tampão PIPES 50mmol, pH 7,5; ATP 0,8mmol; 4-Aminoantipirina 0,60mmol; 4-Clorofenol 1,25mmol. O reagente de uso contém ainda as seguintes concentrações mínimas de enzima por litro: Lipase 120.000U, Glicerolquinase 800U, Glicerol Fosfato Oxidase 3.000U, Peroxidase 800U, sais de magnésio e estabilizantes. A solução permanece estável por 30 dias, se mantida sob refrigeração (2-8°C).

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



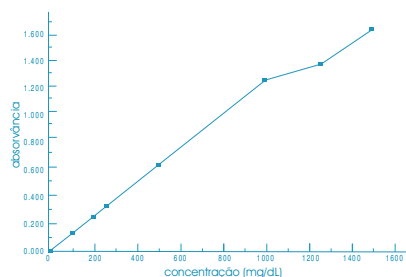
Proceder como segue:

	B	T	P
Reagente de cor	2,0mL	2,0mL	2,0mL
Solução padrão	-	-	20µL
Soro	-	20µL	-

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

Retirar do banho maria e ler as absorvâncias de teste e padrão, em espectrofotômetro ou fotocolorímetro, em **510nm** ou **filtro verde (490-540)**, 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	0,000	0
2	0,125	100
3	0,249	200
4	0,310	250
5	0,620	500
6	1,230	1000
7	1,380	1250
8	1,710	1500

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 1000mg/dL (ver curva acima). Obtendo-se valores mais elevados, diluir a amostra com solução fisiológica e proceder à nova dosagem. Multiplicar o valor encontrado pelo fator de diluição.**
- O kit de Triglicérides 120 Doles possui padrão no intervalo de linearidade da metodologia. 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 deve ser refeito periodicamente e a cada lote do produto.**
- Os padrões utilizados na montagem da curva foram ajustados, tendo como referência: "Glycerol Standards, set. 339-11 de Sigma Chemical Company".

CÁLCULOS

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

Exemplo:

Leitura

Padrão = 0,249

Teste = 0,150

$$\text{Triglicérides (mg/dL)} = \frac{0,150}{0,249} \times 200 = 120$$

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

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

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

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

Exemplo:

Leitura:

Padrão = 0,242; 0,241; 0,243

$$\text{Média aritmética} = \frac{0,242 + 0,241 + 0,243}{3} = 0,242$$

$$\text{Fator (F)} = \frac{200}{0,242} = 826$$

Leitura do teste = 0,150

Triglicérides (mg/dL) = 0,150 x 826 = 124

EXPRESSÃO DO RESULTADO EM UNIDADES S. I.

$$\text{Triglicérides (mmol/L)} = \text{Triglicérides (mg/dL)} \times 0,0113$$

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 níveis de triglicérides podem se apresentar elevados durante a gravidez.
- Algumas drogas podem elevar os níveis de triglicérides, incluindo estrógenos, contraceptivos orais, diuréticos tiazídicos e beta-bloqueadores adrenérgicos.
- Algumas drogas, como o ácido ascórbico (vitamina C), podem reduzir os níveis de triglicérides.

CONTROLE DA QUALIDADE DO SISTEMA

- 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.
- A água utilizada na limpeza do material, no preparo dos reagentes e na dosagem, deve ser de boa qualidade.
- Colunas deionizadoras saturadas liberam íons diversos, aminas e agentes oxidantes, que deterioram os reagentes.
- As pipetagens devem ser precisas.
- 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.
- 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:



Triglicérides	Valores (mg/dL)	Classificação
< 10 anos de idade	≤100	Desejável
	>100	Alto
10 a 19 anos de idade	≤130	Desejável
	>130	Alto
Adultos (> 20 anos de idade)	<150	Ótimo
	150 a 200	Limítrofe
	200 a 499	Alto
	≥500	Muito Alto

SIGNIFICADO CLÍNICO

Atualmente, a principal aplicação da determinação dos triglicerídeos é nas classificações das hiperlipidemias e fenotipagem das lipoproteínas. Os triglicerídeos são encontrados nos quilomícrons e VLDL. Os níveis elevados de triglicerídeos costumam estar relacionados a um risco aumentado de cardiopatia coronariana. Os valores de triglicerídeos tendem a aumentar após o infarto agudo do miocárdio. A obesidade, o estresse emocional, certas dietas e algumas doenças como: diabetes, pancreatite aguda, síndrome nefrótica, uremia, alcoolismo e hipotireoidismo aumentam os níveis dos triglicerídeos.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Foram realizados 42 testes em amostras cujo teor de triglicérides se situava no intervalo de 43 a 922mg/dL. Esses ensaios foram realizados em paralelo com uma metodologia de referência (GPO- Trinder). A comparação do kit de Triglicérides 120 Doles (Y) com a metodologia mencionada (X) deu origem à seguinte equação de regressão linear: $Y = 4,63 + 1,006X$, sendo o coeficiente de correlação 0,99.

Testes de recuperação mostram que a mesma situa-se entre 97,5 - 102%.

O erro da média foi de 1,16%.

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

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração (mg/dL)	90,32	360,12	890,84
Desvio padrão	1,47	3,88	8,16
Coefficiente de variação (%)	1,63	1,08	0,92

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

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração (mg/dL)	80,77	379,19	851,25
Desvio padrão	2,58	4,51	10,50
Coefficiente de variação (%)	3,19	1,19	1,23

Especificidade: a presente metodologia é específica para determinação dos triglicerídeos. Como não há hidrólise dos fosfolípidos na reação de GPO-Trinder, estão ausentes as reações inespecíficas com os fosfolípidos.

Sensibilidade: a absorvância encontrada, de 0,0024, corresponde a 1mg/dL de concentração de glicose dentro da metodologia de GPO-Trinder, quando medida em espectrofotômetro, a 510nm. A sensibilidade do kit está diretamente relacionada com a do aparelho utilizado pelo laboratório.

Diluição da matriz: estudos sucessivos de diluição da matriz mostraram que não há interferência na sensibilidade diagnóstica da presente metodologia de GPO-Trinder

Substâncias interferentes: não utilizar amostras hemolisadas, pois as hemácias são ricas em substâncias cromógenas. Amostras ictericas produzem resultados falsamente baixos, devido à reação da bilirrubina com o Peróxido de Hidrogênio, que reduz a intensidade do produto corado. Certas drogas e substâncias podem afetar os valores de triglicérides (ver em limitações do sistema). Para controle de interferências dessa natureza, recomenda-se que o paciente seja questionado quanto ao uso de medicamentos e orientado para um jejum antes da realização do exame.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Trinder, P.: *Ann. clin. biochem.* 6,24, 1969.
- Megraw, Robert E. Dunn David e Biggs, Homer G.: *Clin. chem.* 25/2, 273-278, 1979.
- Fossati P, e Principe L.: *Clin. chem.* 28/10, 2077-2080, 1982.
- Kaplan, L.A, Pesce A.J.: *Methods in clinical chemistry*;1215-1227,1987.
- Jacobs D.S., Kasten B.L., Demott W. R., Wolfson W.L.: *Laboratory test handbook*, 2ª ed., 346-348, 1990.
- Chernecky C.C., Krech. R.L., Berger B.J.: *Laboratory tests and diagnostic procedures*, 932-933, 1993.
- Cockayne, S.: *Clinical chemistry: concepts and applications*, 176-177,1993.
- Tibúrcio, H.M.: *Controle interno da qualidade analítica*, 1ªed. março/1995.
- Henry, J.B.: *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*; 19ª ed, 216-217, 1996.
- 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

Caixa Postal 1051

CEP: 74001-970 Goiânia - GO - Brasil

e-mail: doles@doles.com.br

M.S.: nº 10231810005

Revisão: 21 (08/2009)

NBR ISO 9001

Sistema da Qualidade certificado desde 1999

