

Método

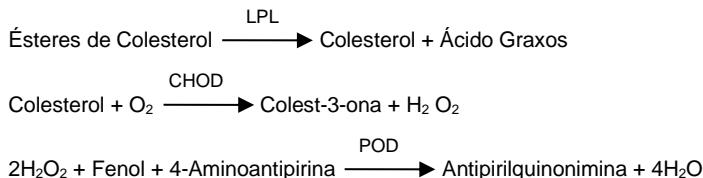
Enzimático (Trinder).

Finalidade

Sistema para a determinação do colesterol total no soro, por reação de ponto final. **Somente para uso diagnóstico in vitro.**

Princípio

O Colesterol total é determinado de acordo com a seguinte reação:



Os ésteres do colesterol presentes na amostra são hidrolisados pela lipoproteína lipase (LPL) formando colesterol livre, que após oxidação pelo colesterol oxidase (CHOD) forma peróxido de hidrogênio. Reagindo com o fenol e 4-aminoantipirina, ocorre oxidação catalisada pela peroxidase (POD), produzindo a Antipirilquinonimina de cor vermelha.

A absorbância do complexo formado, medida em 500 nm, é diretamente proporcional à concentração de colesterol da amostra.

Significado Clínico

O risco cardiovascular de um indivíduo está ligado diretamente ao nível do seu colesterol sérico, principalmente as frações HDL e LDL. Estudos epidemiológicos mostram uma correlação positiva entre os níveis do colesterol, mais diretamente do colesterol LDL e o risco de doença arterial coronariana (DAC). Ao contrário, os níveis de colesterol HDL são inversamente proporcionais ao risco de DAC.

Valores aumentados de colesterol são encontrados na nefrose, na diabetes, no hipotireoidismo, nas doenças colestáticas do fígado e nas hiperlipoproteinemias dos tipos IIa, IIb e III. Níveis diminuídos são encontrados no hipertireoidismo, doenças consumptivas, desnutrição crônica e anemias. O nível de colesterol sérico, juntamente com a hipertensão e o fumo, constitui fatores de risco de aterosclerose e doença arterial coronariana (DAC).

Reagentes

Reagente nº 1 - Reagente de Cor - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Tampão Fosfato (pH 7,50) 65 mmol/L, 4 - Aminoantipirina 0,3 mmol/L, Azida Sódica 15 mmol/L, Fenol 5 mmol/L, Colesterol Oxidase > 250.000 U/L, Lipoproteína Lipase > 750 U/L, Peroxidase > 900 U/L.

Reagente nº 2 - Padrão - Conservar entre 2 e 8°C. Manter vedado para evitar evaporação. Contém: Colesterol 200 mg/dL, Azida Sódica 15 mmol/L.

Estabilidade, Condições de Armazenamento e Transporte

Os reagentes são estáveis até a data de validade impressa no rótulo do produto, quando conservados na temperatura recomendada (2 a 8°C), bem vedados e se evitado de contaminação durante o uso. Antes de serem abertos, os reagentes podem ser transportados em temperatura que não excede 30°C, até um limite de 120 horas. **Não congelar.**

Cuidados Especiais e Precauções

- As amostras a serem analisadas devem ser tratadas como material potencialmente infectante.
- Utilizar os EPI's de acordo com as Boas Práticas de Laboratório Clínico.
- O Reagente de Cor (1) e o Padrão (2) contêm azida sódica que é tóxica e irritante para pele e mucosa.
- As informações de Descarte, Segurança e Primeiros Socorros estão descritas na Ficha Individual de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) deste produto, disponível em www.bioanalitica.com.br ou pelo telefone 0800 006 8111.
- Reagentes de lotes diferentes não devem ser misturados.
- Não utilizar os reagentes quando se apresentarem turvos.
- Evitar deixar os reagentes fora das condições de armazenamento especificadas, quando os mesmos não estiverem em uso.
- O tempo de reação, pipetagens e temperatura de trabalho são muito importantes para obtenção de resultados corretos.
- Usar pipetas de vidro e ponteiras descartáveis específicas para cada amostra, controle, padrão/calibrador e reagente.
- O nível de água do banho-maria deve ser superior ao dos tubos de ensaio que contém as reações.

Materiais Necessários e Não Fornecidos

- Analisador bioquímico automático, semiautomático ou espectrofotômetro;
- Pipetas de vidro e/ou automáticas;
- Ponteiras;
- Tubos de ensaio;
- Cronômetro;
- Banho-maria.

Amostra

Utilizar soro. O analito é estável por 7 dias armazenada entre 2 e 8°C e 6 meses a 20°C negativos, quando livres de contaminação.

Para descarte dos reagentes e materiais biológicos devem-se seguir as normas locais, estaduais ou federais de proteção ambiental.

Interferências e Limitações

O uso de medicamentos como o Ácido Ascórbico (Vitamina C) interfere na reação, pois competem com o cromogênio na reação da peroxidase, fornecendo valores falsamente diminuídos. Por esta razão, deve-se suspender o seu uso pelos menos 12 horas antes da coleta da amostra. Caso haja suspeita sobre a presença de ácido ascórbico manter a amostra em repouso por 90 minutos para minimizar a ação do medicamento. Não utilizar amostras hemolisadas.

Concentrações de bilirrubina até 18,0 mg/dL e triglicérides até 1216 mg/dL não produzem interferências significativas. Valores de hemoglobina maior que 433 mg/dL e ácido ascórbico maior que 4,0 mg/dL produzem interferências significativas nas amostras.

Preparação dos Reagentes

Os reagentes estão prontos para uso.

Procedimento Técnico

Equipamentos Automáticos

Para uso em analisadores automáticos, verificar o protocolo de automação no site www.bioanalitica.com.br ou através do SAC.

Nota: Recomendamos o uso do Calibrador – Ref. BA052 para calibração. Para avaliar a precisão das dosagens, recomendamos o uso do Controle N – Ref. BA115 e Controle P – Ref. BA118.

Método de Ponto Final

Identificar 3 tubos de ensaio: B (Branco), A (Amostra), P (Padrão) e proceder como a seguir:

	Branco	Amostra	Padrão
Amostra	---	10 µL	---
Padrão (2)	---	---	10 µL
Reagente de Cor (1)	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Homogeneizar bem e colocar em banho-maria 37°C por 10 minutos. Ler a absorbância da Amostra e do Padrão em 500 nm (490 - 510 nm), acertando o zero com o Branco. A cor é estável por 60 minutos.

Cálculos

$$\text{Colesterol (mg/dL)} = (\text{Absorbância da Amostra} \div \text{Absorbância do Padrão}) \times \text{Concentração do Padrão}$$

$$\text{Fator de Calibração} = \text{Concentração do Padrão} \div \text{Absorbância do Padrão}$$

Exemplo com Padrão

$$\text{Absorbância da Amostra} = 0,334$$

$$\text{Absorbância do Padrão} = 0,342$$

$$\text{Concentração do Padrão} = 200 \text{ mg/dL}$$

$$\text{Colesterol} = (0,334 \div 0,342) \times 200 = 195,3 \text{ mg/dL}$$

Exemplo com Fator de Calibração

$$Fc = 200 \div 0,342 = 584,8$$

$$\text{Colesterol} = 0,334 \times 584,8 = 195,3 \text{ mg/dL}$$

Características do Desempenho

Comparação de Métodos

O método foi comparado com outro produto com metodologia semelhante através de 40 amostras de soro humano. Através de modelos estatísticos, os resultados foram analisados e resultaram na equação de regressão linear Método Bioanalítica (y) = $-4,234 + 1,042 * \text{Método comparativo (x)}$ e coeficiente de correlação igual a 0,991.

Sensibilidade

Uma amostra proteica não contendo Colesterol, foi utilizada para calcular o limite de detecção do ensaio. A média encontrada foi 2,9200 mg/dL equivalente a 20 determinações, com desvio padrão de 0,5720 mg/dL. A sensibilidade, que indica o limite de detecção do método, corresponde à média mais 3 vezes o desvio padrão, que é igual a 4,6361 mg/dL.

Linearidade

A reação é linear até 500 mg/dL. Para amostras com valores acima de 500 mg/dL ou densidade óptica acima de 0,8, diluir a amostra com Cloreto de Sódio 0,85%, repetir a dosagem e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

Repetibilidade

A repetibilidade foi calculada a partir de 20 determinações sucessivas, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração Média (mg/dL)	37,91	162,13	346,61
Desvio Padrão (mg/dL)	0,48	0,60	3,83
Coeficiente de Variação (%)	1,28	0,37	1,11

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi calculada a partir de 20 determinações sucessivas durante 20 dias consecutivos, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração Média (mg/dL)	48,49	140,63	302,30
Desvio Padrão (mg/dL)	1,82	2,03	8,38
Coeficiente de Variação (%)	3,76	1,45	2,77

Valores de Referência

Estes valores de referência devem ser usados apenas como orientação. Sugere-se que cada laboratório estabeleça seus próprios valores para população atendida. Os resultados dos testes devem ser analisados por um profissional responsável.

Adulto

Colesterol Total	Colesterol HDL	Colesterol LDL
< 200 - Desejável	< 40 - Baixo	< 100 - Ótimo
200 a 239 - Limítrofe	≥ 60 - Desejável	100 a 129 - Limiar ótimo
≥ 239 - Elevado	-----	130 a 159 - Limiar elevado
-----	-----	160 a 189 - Elevado
-----	-----	≥ 190 - Muito elevado

Crianças e Adolescentes

Colesterol Total	Colesterol HDL	Colesterol LDL
< 170 - Desejável	> 40 - Desejável	< 110 - Desejável
170 a 199 - Limítrofe	< 35 - Baixo	100 a 129 - Limítrofe
≥ 239 - Elevado	-----	≥ 130 a 159 - Elevado

Para converter os valores de mg/dL em mmol/L (SI) multiplicar por 0,026.

Controle Interno da Qualidade

O laboratório clínico deve possuir um programa interno de controle da qualidade, para assegurar que todos os procedimentos, normas, limites e tolerância para variações sejam claramente definidos. Ressaltamos que todos os sistemas de medição apresentam uma variabilidade analítica, que deve ser monitorada pelos laboratórios. Portanto, é recomendável a utilização de controles, que permitem avaliar a precisão e a exatidão das dosagens. Sugere-se utilizar soluções estabilizadas da linha de controles e calibradores da Bioanalítica.

Observações

• A limpeza e secagem adequadas do material usado são fatores fundamentais para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.

• A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de agentes contaminantes. A limpeza da vidraria deve ser feita com detergente neutro. O enxágue deve ser exaustivo sendo os últimos com água destilada ou deionizada.

• A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes e usar nas medições, a água deve ser do Tipo II, com resistividade > 1 megaohms/cm ou condutividade < 1 microsiemens/cm e concentração de silicatos < 0,1 mg/L. Para o enxágue inicial da vidraria, a água pode ser do Tipo III, com resistividade > 0,1 megahoms ou condutividade < 10 microsiemens.

No enxágue final, utilizar água do Tipo II. Coluna deionizadora com sua capacidade saturada libera água alcalina, vários íons e também substâncias com grande poder de oxidação ou redução que deterioram os reagentes em poucos dias ou mesmo horas, alterando de maneira imprevisível os resultados. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle da qualidade da água.

Referências Bibliográficas

- Westgard JO, Barry PL, Hunt MR. Clin. Chem. 1981; 27: 493-501.
- Fredrickson DS, Levy RJ, Lee RS. New Engl J Med 1967; 276:24, 94, 148, 215, 276
- Tonks, DB., Quality Control in Clinical Laboratories, Warner-Chilcott Laboratories, Diagnostics Reagents Division, Scarborough, Canadá, 1972.
- Rifai N, Warnick GR, Dominicak MH. Handbook of lipoprotein testing. AACC Press, Washington, 1997: 75-97.
- Alain CA, Poon LS, Cahn CSG, Richmond W, Fu PC. Clin Chem 1974; 20:470.
- Good NE, Winger GD, Winter W, Connolly TN, Izawa S, Singh RMM. Biochemistry 1966; 5:467.
- Bioanalítica: Dados internos de arquivo do P&D.

Termos e Condições de Garantia

A Bioanalítica Diagnóstica garante o desempenho e a qualidade deste produto, dentro das especificações, até a data de expiração indicada nos rótulos, desde que utilizados, armazenados e transportados nas condições adequadas.

Apresentações

Ref.	Volume	Reagente 1	Reagente 2
BA082-200	200 mL	2 x 100 mL	1 x 3 mL
BA082-400	400 mL	4 x 100 mL	1 x 3 mL

Bioanalítica Diagnóstica S/A.

Rua Álvares da Silva, 12 - União

CEP: 31160-360 – Belo Horizonte MG - Brasil

Tel. +55 31 3657-0051

www.bioanalitica.com.br

E-mail: bioanalitica@bioanalitica.com.br

CNPJ: 20.264.948/0001-61 – Indústria Brasileira

SAC: 0800 006 8111

E-mail: sac@bioanalitica.com.br

Revisão: Outubro / 2022.