



6. Medidor de tempo.

Amostra:

Soro livre de hemólise. O HDL colesterol no soro é estável por 14 horas entre 15 - 30°C, 6 dias se mantido entre 2 - 8°C. A amostra poderá ser congelada por 1 mês a (-20°C) ou 1 ano a (-70°C). Todas as amostras e controles são considerados potencialmente infectantes, portanto sugerimos manuseá-las seguindo as normas estabelecidas de Biossegurança.

Preparo do Paciente:

É recomendado um jejum de 8 horas. Todavia, poderá ser alterado segundo orientação médica.

Interferências:

Bilirrubina até 20 mg/dL, Hemoglobina até 500 mg/dL, Ácido Ascórbico até 50 mg/dL e Lipemia até 500 mg/dL medida como triglicérides, não interferem significativamente no resultado. Algumas drogas e substâncias afetam a concentração do HDL colesterol, sugerimos consultar Young et al.

Parâmetros do Sistema:

Temperatura: 37°C
 Comprimento de Onda: 600 - 700nm.
 Tipo de Reação: Ponto final
 Direção: Crescente
 Vol. Amostra: 10µL
 Vol. Reagente 1: 0,75 mL
 Tempo de Incubação: 5 minutos
 Vol. Reagente 2 : 0,25 mL
 Tempo de incubação : 5 minutos

Calibração:

Utilizar calibrador incluso no kit, o valor do calibrador tem sido determinado por procedimentos adotados pelo Centro de Controle de Doenças (CDC), método de referência para HDL Colesterol, a rastreabilidade só pode ser garantida se forem utilizados reagentes da EBRAM e procedimentos de medição recomendados.

Procedimento Automatizado:

Aplicação no sistema automatizado: vide manual para utilização do equipamento e instruções de uso do reagente.
 Aplicação no sistema semi-automático: proceder como demonstrado a seguir no procedimento manual até o item 4 (2º incubação), em seguida utilizar o equipamento para leitura, seguindo protocolo analítico específico baseado no item Parâmetros do Sistema.

Procedimento Manual:

1. Separar 3 tubos de ensaio e realizar os procedimentos conforme abaixo:

	Branco	Amostra/S.C.	Calibrador
Água destilada	10µL	-	-
Calibrador	-	10µL	-
Amostra/S.C.	-	-	10µL
Reagente R1	0,75mL	0,75mL	0,75mL

2. Homogeneizar os tubos e deixar em Banho-Maria (BM) 37°C por 5 minutos. O nível de água no BM deve ser superior ao nível de reagente nos tubos de ensaio.
 3. Adicionar o R2.

Reagente R2	0,25mL	0,25mL	0,25mL
-------------	--------	--------	--------

4. Homogeneizar os tubos e deixar em Banho-Maria (BM) 37°C por 5 minutos. O nível de água no BM deve ser superior ao nível de reagente nos tubos de ensaio.
 5. Zerar o aparelho com o branco do reagente a 600 nm (600 - 700nm), proceder as leituras registrando as absorbâncias do padrão, amostra e soro controle (S.C.).

Obs.: Procedimento sugerido para espectrofotômetros que requerem volume mínimo de 1,0 mL e podem ser ajustados proporcionalmente sem influência no desempenho do teste. Salientamos que volumes de amostra menores do que 10 µL aumentam a imprecisão da medição em aplicações manuais.

Cálculos:

(Abs. = Absorbância)
 (Conc. = Concentração)

$$\frac{\text{HDL Colesterol da Amostra (mg/dL)}}{\text{Abs. amostra}} \times \frac{\text{Abs. calibrador}}{\text{Conc. Calibrador (mg/dL)}}$$

Exemplo:

Abs. da amostra = 0,020
 Abs. do calibrador = 0,025
 Conc. do calibrador = 58 mg/dL

$$\text{HDL Colesterol Amostra} = \frac{0,020}{0,025} \times 58$$

HDL Colesterol Amostra = 46,4 mg/dL

Obs: mg/dL x 0.02586 = mmol/L

Linearidade:

Quando executado de acordo com o recomendado, o teste é linear até 180 mg/dL.

Amostras com valores superiores a 180 mg/dL devem ser diluídas com solução salina a ponto de ficarem entre de 1,06 a 180 mg/dL e os resultados devem ser multiplicados pelo fator de diluição.

Controle de Qualidade:

Cada laboratório deve manter um programa interno de qualidade que defina objetivos, procedimentos, normas, limites de tolerância e ações corretivas. Deve-se manter também um sistema definido para se monitorar a variação analítica do sistema de medição. Aconselhamos o uso dos soros controle Quimicontrol Normal e Quimicontrol Anormal Ebram Cód. 7024/12024 e 7031/12031.

Valores Esperados:

Homens: 30 - 70 mg/dL
 Mulheres: 30 - 85 mg/dL
 Estes valores são dados unicamente como título orientativo. A V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, sugere que laudos laboratoriais referentes aos perfis lipídicos tenham uniformidade em todo território nacional, no tocante aos valores de referência e ao alerta indicativo para o diagnóstico de Hipercolesterolemia Familiar (HF). De acordo com a Diretriz, para adultos acima de 20 anos valores de HDL menores a 40 mg/dL são considerados baixos e significativamente importantes na avaliação de doença coronariana, independentemente dos fatores de risco, e valores maiores a 60 mg/dL são considerados desejáveis para oferecer alguma proteção contra esta doença.

Estudos Comparativos:

Estudos executados entre este procedimento e uma metodologia similar produziu os seguintes resultados estatísticos:

Número de Amostras:	30
Intervalo dos resultados	110,3 – 130,8 mg/dL
Coefficiente de Correlação:	0,998
Inclinação:	1,0
Intercepta:	0,65 (mg/dL)

Precisão:

Estudos de precisão foram executados com dois níveis (normal e patológico) sendo que cada amostra fora processada por 10 vezes e os seguintes dados estatísticos foram encontrados:

N=10	Nível 1	Nível 2
Média (mg/dL)	20,8	99,7
D.P. (mg/dL)	0,9	1,00
C.V. (%)	3,6	1,02

Exatidão:

As amostras foram processadas por 10 dias consecutivos, uma vez por dia e em duplicata. Os seguintes dados estatísticos foram encontrados:

N=10	Nível 1	Nível 2
Média (mg/dL)	23,6	99,5
D.P. (mg/dL)	1,0	2,8
C.V. (%)	4,2	3,1

Sensibilidade Metodológica:

1.06 mg/dL

Especificidade:

Como as amostras foram selecionadas aleatoriamente em pacientes de ambulatório e hospitalizados, pode-se inferir que o método tem uma especificidade metodológica adequada.

Observações:

- 1.A limpeza e a secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
- 2.A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes e usar nas medições, deve ter resistividade US1 mega ohm ou condutividade £ 1 microsiemens e concentração de silicatos < 0,1 mg/L (água tipo II). Para o enxágue da vidraria a água pode ser do tipo III, com resistividade US 0,1 megaohms ou condutividade UR 10 microsiemens. No enxágue final utilizar água tipo II.

Apresentação:

Linha Bioquímica: R1=6x10mL + R2=2x10mL + Calib=1x1,0mL
 Linha Bulk: R1=1x210mL + R2=1x70mL + Calib=1x1,0mL
 Linha Hitachi 917: R1=2x60mL + R2=1x40mL + Calib=1x1,0mL
 Linha Quimiset 450: R1=3x45mL + R2=1x45mL + Calib=1x1,0mL
 Para mais informações sobre sistemas automáticos, entrar em contato com o SAC EBRAM - (011) 2291-2811, sac@ebram.com ou www.ebram.com

Referência Bibliográfica:

1. Castell, W.P. et al. Cholesterol and Other Lipids in Coronary Heart Disease Circulation 55:757
2. Stein, E.A. Myers, G.L. Lipids, Lipoproteins and Apolipoproteins in Tietz Textbook of Clinical Chemistry, Second Edition, Burtis, C. Ashwood, A. (Eds.) CV Mosby Co. 23:1002-83 (1994).
3. Warmick, R. Nguyen, T. Albens, A.A. Comparison of Improved Precipitation Methods for Quantification of High Density Lipoprotein Cholesterol – Clin. Chem. 1985: 31:217-22.
4. Warmick, R. Wood, P. National Cholesterol Education Program Recommendations for Measurement of High Density Lipoprotein Cholesterol, Executive Summary, Clinical Chemistry, Vol. 41, N° 10, 1996.
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation Protocol Number 7, Vol. 4 N° 8, June 1984
6. Young, D.S. , Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, Third Edition, AACC Press (1990)
7. National Institute of Health Publication N° 01-3670, May 2001.
8. Arquivos da EBRAM.
9. PNCQ. Outubro 2013.

**QUIMICOL -H- HDL Colesterol
 ULTRA-SENSÍVEL**

Finalidade:

Reação inibitória espectrofotométrica para determinação quantitativa de HDL colesterol em amostras de soro humano. Somente para uso diagnóstico "in vitro".

Princípio:

O princípio do teste é baseado na aceleração da reação do colesterol oxidase e na quebra seletiva do HDL através de um detergente específico. Na primeira reação, o colesterol livre das moléculas, não - HDL (colesterol total, LDL e VLDL), é solubilizado e consumido pelo colesterol oxidase (CO) em uma reação colorimétrica.

No segundo reagente, um detergente específico solubiliza o HDL, permitindo a reação com um acoplador cromógeno, desenvolvendo cor para a determinação quantitativa de HDL -C.

Metodologia:

Direto / Ultra-sensível

Significado Clínico:

O papel das partículas HDL no metabolismo lipídico é do transporte do colesterol do tecido periférico ao fígado, ou seja, as partículas esféricas de HDL são captadas pelo fígado por endocitose mediada por receptor, e os ésteres de colesterol são degradados. O colesterol assim liberado pode ser reembalado pela lipoproteínas, convertido em ácidos biliares ou secretado na bile para remoção do corpo. Este processo é conhecido como transporte reverso do colesterol e tem sido apresentado como um mecanismo cardíaco protetor. Baixos níveis do HDL-Colesterol têm repetidamente sido associados com um aumento do risco de doenças do coração e doença da artéria coronária. Então, a determinação do HDL colesterol sérico tem sido reconhecida como uma ferramenta útil na identificação de pacientes de altos riscos. O Painel de Tratamento de Adulto do Programa Nacional de Educação do Colesterol (NCEP) recomenda que todos os adultos de 20 anos de idade e acima deveriam ter níveis de colesterol total e HDL colesterol medidos, no mínimo a cada 5 anos para procurar risco de doença coronária.

Reagentes:

Reagente 1: Pronto para uso. Conservar entre 2 - 8°C e mantê-lo ao abrigo da luz.

Contém Buffer (pH6.5) 10 mmol/L, TODB 1mmol/L, Ascórbico oxidase 3.0 U/ml, PVS 2 mg/L, PEGME 0.2%, MgCl₂ 2mmol/L

Reagente 2: Pronto para uso. Conservar entre 2 - 8°C e mantê-lo ao abrigo da luz.

Contém Buffer (pH6.5) 10 mmol/L, Colesterol Esterase 4 U/ml, Colesterol Oxidase 10 U/ml, Peroxidase 30 U/ml, 4 aminoantipirina 2.5 mmol/L, Detergente 0.5%

Os reagentes não abertos são estáveis até a data de vencimento impressa no rótulo do produto e on board (em um compartimento refrigerado do analisador) possuem estabilidade de 30 dias. Durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos a contaminação de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

Calibrador: Conservar entre 2 - 8 °C. Contém: soro humano liofilizado com lipoproteínas de diversas classes incluindo lipoproteína de alta densidade (HDL).

- Verificar a concentração no rótulo do frasco.

MODO de PREPARO do CALIBRADOR

1. Golpear o frasco levemente com os dedos para desprender o material liofilizado.

2. Utilizando uma pipeta volumétrica calibrada, adicionar exatamente 1,0 mL de água destilada no frasco.

3. Recolocar a tampa no frasco e deixar em repouso na temperatura ambiente por 30min.

4. Antes de utilizar, inverta suavemente o frasco de 5 a 10 vezes até o liofilizado dissolver totalmente.

Após reconstituição, o calibrador possui estabilidade de 07 (sete) dias se armazenado entre 2 - 8°C.

Precauções e Cuidados Requeridos:

Este reagente deve ser usado somente para uso de diagnóstico "in vitro".

Não pipetar com a boca. Evitar contato com a pele e roupa. No caso de contato com os olhos, lavar com grande quantidade de água e procurar auxílio médico.

Deve-se monitorar a temperatura do ambiente de trabalho bem como o tempo de reação para obtenção de resultados corretos. Não usar se o reagente apresentar turbidez e, se houver dificuldade em conseguir os valores estabelecidos para o soro controle fresco.

Material Necessário não Fornecido:

1. Banho-maria ou analisador capaz de manter uma temperatura de 37°C e capaz de medir absorbância entre 600 - 700nm.
2. Pipetas para medição de amostras e reagente.
3. Água destilada/deionizada.
4. Consumíveis do analisador quando usado.
5. Soro controle

