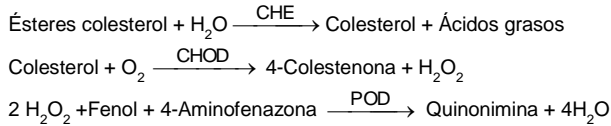


Determinação quantitativa de colesterol IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCÍPIO DO METODO

O colesterol presente na amostra origina um composto corado segundo a seguinte reacção:


 A intensidade da coloração formada é proporcional á concentração de colesterol presente na amostra ensaiada^{1,2}.

SIGNIFICADO CLINICO

 O colesterol é uma gordura que está presente em todas as células do organismo. O fígado produz naturalmente todo o colesterol de que necessita para formar as membranas celulares e produzir certas hormonas. A determinação do colesterol é uma das ferramentas mais importantes para o diagnóstico e classificação das lipémias. O aumento do nível de colesterol é um dos principais factores de risco cardiovascular^{5,6}.

O diagnóstico clínico deve realizar-se tendo em conta todos os dados clínicos e de laboratório.

REAGENTES

R 1	PIPES pH 6,9	90 mmol/L
Tampão	Fenol	26 mmol/L
R 2 (Nota 2)	Colesterol esterase (CHE)	300 U/L
Enzimas	Colesterol oxidase (CHOD)	300 U/L
	Peroxidase (POD)	1250 U/L
	4 - Aminofenazona (4-AF)	0,4 mmol/L
COLESTEROL CAL	Padrão primário aquoso de Colesterol 200 mg/dL. Contém Triton X-114 10-15%.	

PRECAUÇÕES

CAL: H225- Líquido e vapor facilmente inflamáveis. H318- Provoca lesões oculares graves. H412- Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.

Seguir os conselhos de prudência dados em SDS e etiqueta.

PREPARAÇÃO

Reagente de trabalho (RT): Dissolver (→) o conteúdo de um frasco de R 2 Enzimas num 1 frasco de R 1 Tampão

Tapar e misturar suavemente até dissolução.

Estabilidade (RT): 4 meses no frigorífico (2-8°C) ou 40 dias 15-25°C.

Manter protegido da luz.

CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE

Todos os componentes do kit são estáveis, até ao final do prazo de validade indicado no rótulo, quando mantidos nos frascos bem fechados, a 2-8°C, protegidos da luz e evitando a sua contaminação.

Não usar os comprimidos se eles estiverem fragmentados.

Não usar reagentes após a data indicada.

Indicadores de deterioração dos reagentes:

- Presença de particulares e turvação.
- Absorvâncias do branco a 505 nm ≥ 0,1.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro ou analisador para leituras a 505 nm (500-550).
- Cuvetes de 1,0 cm de passo de luz.
- Equipamento habitual de laboratório.

AMOSTRAS

 Soro ou plasma^{1,2}: Estabilidade da amostra 7 dias a 2-8°C e 3 meses se mantida a amostra congelada (-20°C).

PROCEDIMENTO

- Condições de trabalho:
Comprimento de onda: 505 nm (500-550)
Cuvete: 1 cm passo de luz
Temperatura: 37°C /15-25°C
- Ajustar o espectrofotómetro a zero com a água destilada.
- Pipetar para uma cuvette (Nota 4):

	Branco	Padrão	Amostra
RT (mL)	1,0	1,0	1,0
Padrão (Nota 1,3) (µL)	--	10	--
Amostra (µL)	--	--	10

- Misturar e incubar 5 minutos a 37°C ou 10 min. a temperatura ambiente.

- Ler a absorvância (A) do Padrão e da amostra, frente ao Branco de reagente. A cor é estável como mínimo 60 minutos.

CÁLCULOS

$$\frac{(A) \text{ Amostra} - (A) \text{ Branco}}{(A) \text{ Padrão} - (A) \text{ Branco}} \times 200 \text{ (Conc. Padrão)} = \text{mg/dL de colesterol na amostra}$$

Factor de conversão: mg/dL x 0,0258= mmol/L.

CONTROLO DE QUALIDADE

É conveniente analisar juntamente com as amostras, os soros controlo valorizados:

SPINTROL H Normal e Patológico (Ref. 1002120 e 1002210).

Se os valores determinados estiverem fora do intervalo de tolerância, verificar o equipamento, os reagentes e o calibrador.

Cada laboratório deve dispor do seu próprio Controlo de Qualidade e estabelecer correções caso os controlos não cumpram com as tolerâncias.

VALORES DE REFERÊNCIA

 Avaliação do risco^{5,6}:

Menos de 200 mg/dL	Normal
200-239 mg/dL	Moderado
≥ 240	Alto

Estes valores são orientativos. É recomendável que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores de referência.

CARACTERISTICAS DO MÉTODO
Intervalo de medida: Desde o *limite de detecção* de 0 mg/dL até ao *limite de linearidade* de 900 mg/dL.

Se a concentração for superior ao limite de linearidade, diluir a amostra 1/2 com NaCl 9 g/L e multiplicar o resultado final por 2.

Precisão:

Média (mg/dL)	Intraserie (n=20)		Interserie (n=20)	
	90,4	187	92,8	193
SD	1,15	1,01	1,98	2,39
CV (%)	1,27	0,54	2,14	1,24

Sensibilidade analítica: 1 mg/dL = 0,00152 A.

Exactidão: Os reagentes SPINREACT (y) não mostram diferenças sistemáticas significativas quando se comparam com outros reagentes comerciais (x).

Os resultados obtidos com 50 amostras foram os seguintes

 Coeficiente de correlação (r)²: 0,99541.

Equação da recta de regressão: y= 0,95293x – 3,020.

As características do método podem variar segundo o analisador utilizado.

INTERFERÊNCIAS

 Não se observaram interferências de hemoglobina até 5 g/L e bilirrubina até 10 mg/dL^{1,2}.

 Estão descritas várias drogas e outras substâncias que interferem na determinação do colesterol^{3,4}.

NOTAS

- CHOLESTEROL CAL: Devido á natureza do produto, é aconselhável manuseá-lo com muito cuidado, já que se pode contaminar com facilidade.
- LCF (*Lipid Clearing Factor*) está integrado no reagente.
- A calibração com o padrão aquoso pode dar lugar a erros sistemáticos em métodos automáticos. Neste caso, recomenda-se utilizar calibradores séricos.
- Usar pontas de pipeta descartáveis, limpas para a sua dispensação.
- SPINREACT dispõe de instruções detalhadas para a aplicação deste reagente em diferentes equipamentos.**

BIBLIOGRAFIA

- Naito H.K. Cholesterol. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1194-11206 and 437.
- Meiattini F. et al. The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone Chromogenic System. Clin Chem 1978; 24 (12): 2161-2165.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

APRESENTAÇÃO

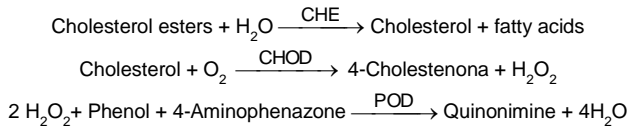
Ref: 1001090	R1: 10 x 50 mL, R2: 10 → 50 mL, CAL: 1 x 5 mL
Ref: 1001091	R1: 10 x 20 mL, R2: 10 → 20 mL, CAL: 1 x 5 mL
Ref: 1001092	R1: 4 x 125 mL, R2: 4 → 125 mL, CAL: 1 x 5 mL
Ref: 1001093	R1: 4 x 250 mL, R2: 4 → 250 mL, CAL: 1 x 5 mL

Quantitative determination of cholesterol IVD

Store at 2-8°C

PRINCIPLE OF THE METHOD

The cholesterol present in the sample originates a coloured complex, according to the following reaction:



The intensity of the color formed is proportional to the cholesterol concentration in the sample^{1,2}.

CLINICAL SIGNIFICANCE

Cholesterol is a fat-like substance that is found in all body cells. The liver makes all of the cholesterol the body needs to form cell membranes and to make certain hormones.

The determination of serum cholesterol is one of the important tools in the diagnosis and classification of lipemia. High blood cholesterol is one of the major risk factors for heart disease^{5,6}.

Clinical diagnosis should not be made on a single test result; it should integrate clinical and other laboratory data.

REAGENTS

R 1 Buffer	PIPES pH 6,9 Phenol	90 mmol/L 26 mmol/L
R 2 (Note 2) Enzymes	Cholesterol esterase (CHE) Cholesterol oxidase (CHOD) Peroxidase (POD) 4 - Aminophenazone (4-AP)	300 U/L 300 U/L 1250 U/L 0,4 mmol/L
CHOLESTEROL CAL	Cholesterol aqueous primary standard 200 mg/dL. Contains Triton X-114 10-15%.	

PRECAUTIONS

CAL: H225- Highly flammable liquid and vapor. H318- Causes serious eye damage. H412- Harmful to aquatic life with long lasting effects. Follow the precautionary statements given in MSDS and label of the product.

PREPARATION

Working reagent (WR): Dissolve (→) the contents of one vial R 2 Enzymes in one bottle of R 1 Buffer.

Cap and mix gently to dissolve contents.

(WR) is stable: 4 months at 2-8°C or 40 days at 15-25°C.

Avoid direct sunlight.

STORAGE AND STABILITY

All the components of the kit are stable until the expiration date on the label when stored tightly closed at 2-8°C, protected from light and contaminations prevented during their use.

Do not use reagents over the expiration date.

Signs of reagent deterioration:

- Presence of particles and turbidity.
- Blank absorbance (A) at 505 nm ≥ 0,1.

ADDITIONAL EQUIPMENT

- Spectrophotometer or colorimeter measuring at 505 nm (500-550).
- Matched cuvettes 1,0 cm light path.
- General laboratory equipment.

SAMPLES

Serum or plasma^{1,2}: Stability of the sample for 7 days at 2-8°C or freezing at -20°C will keep samples stable for a 3 months.

PROCEDURE

- Assay conditions:
Wavelength: 505 nm (500-550)
Cuvette: 1 cm light path
Temperature: 37°C /15-25°C
- Adjust the instrument to zero with distilled water.
- Pipette into a cuvette (Note 4):

	Blank	Standard	Sample
WR (mL)	1,0	1,0	1,0
Standard (Note 1,3) (µL)	--	10	--
Sample (µL)	--	--	10

- Mix and incubate for 5 min. at 37°C or 10 min. at room temperature.

- Read the absorbance (A) of the samples and Standard, against the Blank. The colour is stable for at least 60 minutes.

CALCULATIONS

$$\frac{(A) \text{ Sample} - (A) \text{ Blank}}{(A) \text{ Standard} - (A) \text{ Blank}} \times 200 \text{ (Standard conc.)} = \text{mg/dL cholesterol in the sample}$$

Conversion factor: mg/dL x 0,0258= mmol/L.

QUALITY CONTROL

Control sera are recommended to monitor the performance of assay procedures: SPINROL H Normal and Pathologic (Ref. 1002120 and 1002210).

If control values are found outside the defined range, check the instrument, reagents and calibrator for problems.

Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

REFERENCE VALUES

Risk evaluation^{5,6}:

Less than 200 mg/dL	Normal
200-239 mg/dL	Borderline
≥ 240 mg/dL	High

These values are for orientation purpose; each laboratory should establish its own reference range.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Measuring range: From *detection limit* of 0 mg/dL to *linearity limit* of 900 mg/dL.

If the results obtained were greater than linearity limit, dilute the sample 1/2 with NaCl 9 g/L and multiply the result by 2.

Precision:

	Intra-assay (n=20)		Inter-assay (n=20)	
	Mean (mg/dL)	SD	CV (%)	
Mean (mg/dL)	90,4	187	92,8	193
SD	1,15	1,01	1,98	2,39
CV (%)	1,27	0,54	2,14	1,24

Sensitivity: 1 mg/dL = 0,00152 A.

Accuracy: Results obtained using SPINREACT reagents (y) did not show systematic differences when compared with other commercial reagents (x).

The results obtained using 50 samples were the following:

Correlation coefficient (r)²: 0,99541.

Regression equation: y= 0,95293x - 3,020.

The results of the performance characteristics depend on the analyzer used.

INTERFERENCES

Hemoglobin up to 5 g/L and bilirubin up to 10 mg/dL, do not interfere^{1,2}.

A list of drugs and other interfering substances with cholesterol determination has been reported^{3,4}.

NOTES

- CHOLESTEROL CAL: Proceed carefully with this product because due its nature it can get contaminated easily.
- LCF (Lipid Clearing Factor) is integrated in the reagent.
- Calibration with the aqueous Standard may cause a systematic error in automatic procedures. In these cases, it is recommended to use a serum Calibrator.
- Use clean disposable pipette tips for its dispensation.
- SPINREACT has instruction sheets for several automatic analyzers.**

BIBLIOGRAPHY

- Naito H.K. Cholesterol. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1194-11206 and 437.
- Meiattini F. et al. The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone Chromogenic System. Clin Chem 1978; 24 (12): 2161-2165.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

PACKAGING

Ref: 1001090	R1: 10 x 50 mL, R2: 10 → 50 mL, CAL: 1 x 5 mL
Ref: 1001091	R1: 10 x 20 mL, R2: 10 → 20 mL, CAL: 1 x 5 mL
Ref: 1001092	R1: 4 x 125 mL, R2: 4 → 125 mL, CAL: 1 x 5 mL
Ref: 1001093	R1: 4 x 250 mL, R2: 4 → 250 mL, CAL: 1 x 5 mL