

HDL-COLESTEROL

PRECIPITARE DIFERENTIATA

Test enzimatic colorimetric

ENDPOINT

Doar pentru utilizarea *in vitro*

CONTINUT

1133010 HDL-Colesterol 2 x 10 mL

REF

PRINCIPIUL

Aceasta tehnica ¹ foloseste o metoda de separare bazata pe precipitarea selectiva a apolipoproteinei B- ce contine lipoproteine (VLDL, LDL si (a) Lpa) - de catre acidul fosfotungic/MgCl₂; sedimentarea precipitatului prin centrifugare, analiza enzimatica a lipoproteinelor cu densitate foarte mare (HDL) din moment ce raman resturi de colesterol in supernatantul limpede.

CONSTITUENTI SI COMPOZIT

R1 Reactiv precipitat. Acid fosfotungstic 0.63 mmol/L, clorura de magneziu 25 mmol/L. Stabilizatori.

CAL Colesterol standard. Colesterol 50 mg/dL (0.38 mmol/L). Matricea organica se bazeaza pe standardul primar.

R2 Colesterol MR. Optativ REF 1118010, 1112010, 1118015.

CONSERVARE SI STABILITATE

Se pastreaza la 2-8°C.

Reactivii sunt stabili pana la data expirarii inscrisa pe eticheta.

PROBE

Ser sau plasma EDTA libere de hemoliza prelevate de la pacient. Retrageti din celule intr-un interval de 3 ore de venicultura. Probele ar trebui pastrate la 4-8°C timp de 2 saptamani, si la -20°C timp de 3 luni fara ca HDL colesterolul sa se altereze.

Supernatul ce contine fractii de HDL este preparat in mod conventional in ziua in care proba a fost prelevata si poate fi analizata dupa 2 saptamani la 4-8°C sau timp de 3 luni la -20°C pastrate intr-un refrigerador care nu se dezgheata automat.

PREPARAREA REACTIVULUI

Reactivii si standardul sunt gata de a fii folositi.

INTERFERENTE

- Hemoliza 9.200 mg/dL) si bilirubina (>10 mg/dL) nu intervin in test. ³
- Probele tulburi pot indica un numar mare de trigliceride sau probe.

MATERIALE DE LUCRU

I. Precipitare

- Dilutor si pipete
- Tuburi de centrifugare (13 x 100 m/m)
- Mixer vortex
- Centrifuga desktop

II. Colorimetrie

- Kit pentru masurarea Colesterolului Total
- Temperatura constanta in incubator setata la 37°C.
- Fotometru sau colorimetru pentru masurarea absorbantei la 550±10 nm.

METODA DE LUCRU

I. Precipitare

1. Aduceti reactivii si probele la temperatura camerei.
2. Pipetati in tuburile test:

Proba sau Standard	0.2 mL
Reactiv precipitat	0.4 mL

Proba	1
Cantitate ----- = -----	
Reactiv	2
Factor de dil. =	3

3. Amestecati si lasati sa stea timp de 10 minute la temperatura camerei.
4. Centrifugati timp de 10 minute la 4000 r.p.m., sau 12000 r.p.m.
5. Separati lichidul limpede supernatant intr-un interval de 2 ore.

In cazul supernatantilor ce sunt tulburi- cauzata de o cantitate de trigliceride mare (>350 g/dL) proba ar trebui sa fie diluata cu 1:2 solutie salina si pasii 2, 3, 4 si 5 sa fie repetati. Inmultiti rezultatul colorimetriei cu 4.

II Colorimetrie

1. Aduceti Monoreactivul de Colesterol MR si kitul de colesterol standard (50 mg/dL) la temperatura camerei.
2. Pipetati in tuburi:

TUBURI	Blank	Proba Supernat	Standard Supernat
Monoreactiv	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL
Supernat	-	50 µL	-
Standard	-	-	50 µL

3. Amestecati si lasati sa se linisteasca tuburile timp de 10 minute la temperatura camerei sau timp de 5 minute la 37°C
4. Cititi absorbanta (A) a supernatantului si standardul la 550 nm fata de reactivul blank.

Culoarea este stabila timp de cel putin 30 minute ferita de lumina.

METODA DE CALCUL

$$\frac{A_{\text{Supernatant}}}{A_{\text{Standard}}} \times C_{\text{Standard}} \times \text{Factor dilutie} = \text{mg/dL HDL-Colesterol}$$

In cazul in care rezultatele trebuie sa fie exprimate in unitati SI aplicati formula:

$$\text{Mg/dL} \times 0.259 = \text{mmol/L}$$

VALORI DE REFERINTA ⁴

Valori clinice de HDL-Colesterol folosite in clasificarea grupelor de risc.

Colesterol din lipoproteine cu o densitate ridicata		RISC
Barbati	> 55 mg/dL (> 1.42 mmol/L)	Scazut
	35-55 mg/dL (0.90-1.42 mmol/L)	Moderat
	< 40 mg/dL (<1.04 mmol/L)	Ridicat

Femei	>65 mg/dL (>1.68 mmol/L)	Scazut
	45-65 mg/dL (1.16-1.68 mmol/L)	Moderat
	< 45 mg/dL (<1.16 mmol/L)	Ridicat

SEMNIFICATIA MEDICALA

Nivelul de colesterol HDL scazut este un indicator independent de afectiunea coronariana a inimii. La ATP III ⁴ nivelul de colesterol HDL scazut este categoric un nivel <40 mg/dL (1.04 mmol/L), valoare diferita de nivelul < 35 mg/dL in ATP-ul II (1993).

Nivelul de Colesterol HDL scazut reprezinta factorul de risc in estimarea pericolului aparitiei afectiunilor coronariene intr-un interval de 10 ani, si are cateva cauze: un nivel de trigliceride crescut, superponderabilitatea si obezitatea, inactivitatea fizica, si diabetul de tip 2. Alte cauze sunt fumatul, consumarea unor cantitati foarte mari de carbohidrati (> 60% de calorii) si anumite medicamente cum ar fi steroizii anabolici si agentii progestionali.

PERFORMANTELE ANALIZEI

- **Linearitate.** Pana la 275 mg/dL
- **Precizie.**

Mg/dL	In timpul analizei*			Intre analize**		
Media	42.1	45.8	54.6	42.1	45.8	54.6
DE	0.23	0.23	0.2	0.27	0.28	0.31
CV%	0.54	0.5	0.34	0.64	0.61	0.52
N	10	10	10	10	10	10

*Replicati: 10 pentru fiecare nivel

Instrument: CECIL CE 2001

**Replicati: 10 pentru fiecare nivel timp de 8 zile

-**Sensibilitate:** Folosind reactiv/proba de 1:3 la 550 nm, 10 mg de colesterol va produce o absorbanta neta de aproximativ 0.037.

-**Corelare:** Aceasta analiza (y) a fost comparata cu o metoda similara comerciala (x). Rezultate obtinute:

$$N = 25 \quad r = 0.995 \quad y = 0.985 + 2.6$$

REFERINTE

1. Burstein, M., Scholnick, H.R. and Morfin, R. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 40 : 560 (1980).
2. Finley, P.R., Shifman, R.B., Williams, R.S. and Lichti, D.I. Clin. Chem. 24 : 931 (1971).
3. Tietz, N.W. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd Edition. W.B. Saunders Co. Philadelphia, PA. (1995).
4. SPECIAL REPORT. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA. 285 : 2486 (2001).