



# HDL Colesterol

*FT*

Reactivo precipitante (ácido fosfotúngstico) para la separación de las Lipoproteínas de Alta Densidad (HDL) en suero o plasma

## SIGNIFICACION CLINICA

Las lipoproteínas plasmáticas son partículas esféricas que contienen cantidades variables de colesterol, triglicéridos, fosfolípidos y proteínas.

Los fosfolípidos, el colesterol libre y las proteínas constituyen la superficie externa de la partícula lipoproteica, mientras que su core contiene en mayor proporción colesterol esterificado y triglicéridos.

Estas partículas solubilizan y transportan el colesterol en el torrente sanguíneo.

La proporción relativa de proteína y lípido determina la densidad de estas lipoproteínas y proveen las bases sobre las cuales establecer una clasificación. Estas clases son: quilomicrones, proteínas de muy baja densidad (VLDL), proteínas de baja densidad (LDL) y proteínas de alta densidad (HDL). Numerosos estudios clínicos han demostrado que las diferentes clases de lipoproteínas tienen distintos y variados efectos en el riesgo de enfermedad coronaria.

La función principal de las HDL en el metabolismo lipídico es la captación y transporte de colesterol desde los tejidos periféricos al hígado en un proceso conocido como transporte reverso de colesterol (mecanismo cardioprotectivo).

El HDL colesterol bajo, está asociado con un alto riesgo de enfermedad cardíaca. Por este motivo la determinación de HDL colesterol es una herramienta útil en la identificación de individuos de alto riesgo.

## FUNDAMENTOS DEL METODO

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) se separan precipitando selectivamente las lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL y VLDL) mediante el agregado de ácido fosfotúngstico en presencia de iones magnesio.

Las HDL quedan en el sobrenadante separado por centrifugación, donde se realiza la determinación del colesterol ligado a las mismas, empleando el sistema enzimático Colesterol oxidasa/Peroxidasa con colorimetría según Trinder (Fenol/4-AF).

## REACTIVOS PROVISTOS

**A. Reactivo A** (Reactivo Precipitante): solución de ácido fosfotúngstico 0,44 mmol/l y cloruro de magnesio 20 mmol/l.

## REACTIVOS NO PROVISTOS

**Colestat enzimático, Colestat enzimático AA o Colestat enzimático AA líquida**, de Wiener lab.

## INSTRUCCIONES PARA SU USO

**Reactivo A:** listo para usar.

## PRECAUCIONES

El reactivo es para uso diagnóstico "in vitro".

Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de química clínica.

Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

## ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE

### ALMACENAMIENTO

El Reactivo Provisto es estable a temperatura ambiente (< 25°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

## INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Cualquier indicio de contaminación bacteriana puede ser signo de deterioro del reactivo.

## MUESTRA

Suero o plasma

**a) Recolección:** obtener la muestra de la manera habitual.

**b) Aditivos:** en caso de utilizar plasma, recogerlo únicamente con heparina.

**c) Sustancias interferentes conocidas:** anticoagulantes distintos de la heparina y bilirrubinemia mayor de 50 mg/l son causas de interferencia.

Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

**d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento:** separar el suero dentro de la hora de la extracción. Las Lipid Research Clinics recomiendan refrigerar la muestra hasta la realización del ensayo. La conservación de las muestras a temperatura ambiente altera la composición lipoproteica de las muestras aún antes de las 24 horas. Algunos autores mencionan estabilidad de 3 días a 4°C que se prolongan al congelar, pero existe mucha variabilidad entre muestras diferentes, por lo que se recomienda mantener la muestra refrigerada y procesar dentro de las 24 horas.

## MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro.
- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados.
- Tubos de Kahn.
- Cubetas espectrofotométricas de caras paralelas.
- Baño de agua a 37°C.
- Reloj o timer.

## CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda: 505 nm en espectrofotómetro o en

fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm).

- Temperatura de reacción: 37°C
- Tiempo de reacción: 35 minutos
- Volumen de muestra: 200 ul
- Volumen de Reactivo A: 500 ul
- Volumen de Sobrenadante: 200 ul
- Volumen de Reactivo de Trabajo de Colestat enzimático o Colestat enzimático AA/líquida: 2 ml
- Volumen final de reacción: 2,2 ml

#### PROCEDIMIENTO

En un tubo de Kahn medir 200 ul de muestra, y agregar 500 ul de Reactivo A. Homogeneizar agitando (sin invertir) durante 20 segundos y dejar 10 minutos en reposo a temperatura ambiente. Centrifugar 15 minutos a 3.000 r.p.m. o 2 minutos a 12.000 r.p.m. Usar el sobrenadante límpido como muestra. En tres tubos marcados B, S y D, colocar:

	B	S	D
<b>Sobrenadante</b>	-	-	200 ul
<b>Standard</b>	-	20 ul	-
<b>Reactivo de Trabajo</b>	2 ml	2 ml	2 ml

Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C si se usa el Reactivo de Trabajo de **Colestat enzimático AA/líquida** o 15 minutos a 37°C cuando se usa el de **Colestat enzimático**. Retirar del baño y enfriar. Leer a 505 nm en espectrofotómetro o en colorímetro con filtro verde (490-530 nm), llevando a cero con el Blanco.

#### ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

El color de reacción es estable 2 horas por lo que la absorbancia debe ser leída dentro de ese lapso.

#### CALCULO DE LOS RESULTADOS

$$\text{HDL Colesterol (g/l)} = D \times f \quad f = \frac{0,762}{S}$$

$$0,762 = 2 \text{ g/l} \times \frac{VF_E}{V_M} \times \frac{VR_E}{VR_S} \times \frac{V_S}{V_E}$$

donde:

$VF_E$  = volumen final de extracto = 0,7 ml

$V_M$  = volumen de muestra procesada = 0,2 ml

$VR_E$  = volumen de reacción con extracto = 2,2 ml

$VR_S$  = volumen de reacción con Standard = 2,02 ml

$V_S$  = volumen de Standard en la reacción = 0,020 ml

$V_E$  = volumen de extracto en la reacción = 0,2 ml

Si se emplean volúmenes de Reactivo diferentes de 2 ml el factor 0,762 varía y debe ser calculado nuevamente, reemplazando en la fórmula  $VR_E$  y  $VR_S$ .

#### VALORES DE REFERENCIA

El panel de expertos del National Cholesterol Education Program (NCEP) provee los siguientes valores de HDL

colesterol:

0,40 - 0,60 g/l

Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia. No obstante, valores mayores de 0,40 g/l se consideran recomendables y los que se encuentren por encima de 0,60 g/l se han considerado como protectivos. Por el contrario, valores de HDL colesterol por debajo de 0,40 g/l se consideran como índice significativo de riesgo de enfermedad cardíaca coronaria.

#### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.
- La exactitud y precisión dependen fundamentalmente de la observación de las condiciones de precipitación.
- Muestras con trigliceridemia superior a 10 g/l pueden dificultar la precipitación fraccionada dando lugar a sobrenadantes turbios o a una capa de lipoproteínas que flotan sobre la superficie. En tal caso, diluir la muestra al 1/2 con solución fisiológica y repetir la precipitación. El resultado obtenido deberá multiplicarse por 2.

#### PERFORMANCE

**a) Reproducibilidad:** procesando replicados de una misma muestra en el día se obtienen los siguientes valores:

Nivel	D.S.	C.V.
0,32 g/l	$\pm 0,011$ g/l	3,4 %
0,68 g/l	$\pm 0,024$ g/l	3,5 %

**b) Linealidad:** la reacción es lineal hasta 5 g/l.

**c) Límite de detección:** en espectrofotómetro, para una variación de absorbancia de 0,001 D.O., el cambio mínimo de concentración detectable será de 0,0063 g/l de colesterol.

#### PRESENTACION

- 100 ml (Cód. 1220108).

#### BIBLIOGRAFIA

- Castelli, W.; Levitas I. - Current Prescribing 6/77:39 (1977).
- Gordon, T. - Am. J. Med. 62:707 (1977).
- Lopes-Virela, M.F. et al. - Clin. Chem. 23/5:882 (1977).
- Coniglio, R. I.-Acta Bioq. Clin. Latinoam. XXIII/2:201, 1989.
- Cooper, C. - National Heart and Lung Institute, NIH (USA), 1974.
- Expert Panel of National Cholesterol Education Program - JAMA 285/19:2486 (2001).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4<sup>th</sup> ed., 2001.



# HDL Colesterol

*FT*

Reagente precipitante (ácido fosfotúngstico) para a separação das Lipoproteínas de Alta Densidade (HDL) em soro ou plasma

## SIGNIFICADO CLÍNICO

As lipoproteínas plasmáticas são partículas arredondadas que contém quantidades variável de colesterol, triglicerídeos, fosfolípidios e proteínas. Os fosfolípidios, o colesterol livre e as proteínas constituem a superfície externa da partícula lipoproteica, sendo que suas cores contém em maior quantidades colesterol esterificado e triglicerídeos.

Estas partículas solubilizam e transportam o colesterol na corrente sanguínea.

A proporção relativa de proteína e lípidios determina a densidade destas lipoproteínas e provêem as bases sobre as quais pode-se estabelecer uma classificação. A mesma pode ser: quilomicrons, proteínas de muito baixa densidade (VLDL), proteínas de baixa densidade (LDL) e proteínas de alta densidade (HDL). Diferentes estudos clínicos demonstraram que as variadas classes de lipoproteínas tem diferentes e variados efeitos no risco de doenças coronárias. A função principal das HDL no metabolismo lipídico é a captação e transporte de colesterol desde os tecidos periféricos ao fígado com um processo conhecido como transporte reverso do colesterol (mecanismo cardioprotetivo).

O HDL colesterol baixo, associa-se com um alto risco de doença cardíaca. Porém, a determinação de HDL colesterol é uma ferramenta útil na identificação de indivíduos com alto risco.

## FUNDAMENTOS DO MÉTODO

As lipoproteínas de alta densidade (HDL) se separam precipitando seletivamente as lipoproteínas de baixa e muito baixa densidade (LDL e VLDL) mediante a adição de ácido fosfotúngstico em presença de íons de magnésio.

No sobrenadante separado por centrifugação, ficam as HDL e é realizada a determinação do colesterol ligado às mesmas, empregando-se o sistema enzimático Colesterol oxidase/ Peroxidase com colorimetria segundo Trinder (Fenol/4-AF).

## REAGENTES FORNECIDOS

**A. Reagente A** (Reagente Precipitante): solução de ácido fosfotúngstico 0,44 mmol/l e cloreto de magnésio 20 mmol/l.

## REAGENTES NÃO FORNECIDOS

**Colestat enzimático, Colestat enzimático AA ou Colestat enzimático AA líquida**, da Wiener lab.

## INSTRUÇÕES DE USO

**Reagente A:** pronto para uso.

## PRECAUÇÕES

O reagente é para uso diagnóstico "in vitro".

Utilizar os reagentes observando as precauções habituais de trabalho no laboratório de análises clínicas.

Todos os reagentes e as amostras devem ser descartadas conforme à regulação local vigente.

## ESTABILIDADE E INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO

O Reagente Fornecido é estável sob temperatura ambiente (< 25°C) até a data de vencimento indicada na embalagem.

## INDÍCIOS DE INSTABILIDADE OU DETERIORAÇÃO DOS REAGENTES

Qualquer indício de contaminação bacteriana pode ser sinal de deterioração dos reagentes.

## AMOSTRA

Soro ou plasma

**a) Coleta:** obter a amostra da maneira habitual.

**b) Aditivos:** heparina quando for utilizado plasma como amostra.

**c) Substâncias interferentes conhecidas:** anticoagulantes diferentes da heparina e bilirrubinemia maior que 50 mg/dl são causas de interferência.

Referência bibliográfica de Young para efeitos de drogas neste método.

**d) Estabilidade e instruções de armazenamento:** separar o soro dentro de uma hora após a coleta. As Lipid Research Clinics, recomendam refrigerar a amostra até a realização do ensaio. A conservação das amostras a temperatura ambiente altera a composição lipoproteica das amostras antes mesmo das 24 horas. Alguns autores mencionam estabilidade de 3 dias a 4°C que aumenta ao congelar, mas existe variação entre amostras diferentes, pelo qual recomenda-se manter a amostra sob refrigeração e processar dentro das 24 horas.

## MATERIAL NECESSÁRIO ( não fornecido)

- Espectrofotômetro ou fotocolorímetro.
- Micropipetas e pipetas para medir os volumes indicados.
- Tubos de Kahn.
- Cubetas espectrofotométricas de faces paralelas.
- Banho-maria a 37°C.
- Relógio ou timer.

## CONDIÇÕES DE REAÇÃO

- Comprimento de onda: 505 nm em espectrofotômetro ou em fotocolorímetro com filtro verde (490-530 nm).
- Temperatura de reação: 37°C
- Tempo de reação: 35 minutos
- Volume da amostra: 200 ul

- Volume de Reagente A: 500 ul
- Volume de Sobrenadante: 200 ul
- Volume de Reagente de Trabalho de Colestat enzimático ou Colestat enzimático AA/líquida: 2 ml
- Volume final de reação: 2,2 ml

#### PROCEDIMENTO

Em um tubo de Kahn medir 200 ul de amostra, e acrescentar 500 ul de Reagente A. Homogeneizar agitando (sem inverter) durante 20 segundos e deixar 10 minutos em repouso a temperatura ambiente. Centrifugar 15 minutos a 3.000 r.p.m. ou 2 minutos a 12.000 r.p.m. Usar o sobrenadante limpo como amostra. Em três tubos marcados B, P e D, colocar:

	B	P	D
<b>Sobrenadante</b>	-	-	200 ul
<b>Padrão</b>	-	20 ul	-
<b>Reagente de Trabalho</b>	2 ml	2 ml	2 ml

Misturar e incubar durante 5 minutos a 37°C quando seja utilizado o Reagente de Trabalho de **Colestat enzimático AA/líquida** ou 15 minutos a 37°C quando seja utilizado o de **Colestat enzimático**. Retirar do banho e esfriar. Ler a 505 nm em espectrofotômetro ou em colorímetro com filtro verde (490-530 nm), zerando com o Branco.

#### ESTABILIDADE DA MISTURA DE REAÇÃO FINAL

A cor da reação é estável durante 2 horas, portanto a absorvância deve ser lida dentro deste intervalo.

#### CÁLCULO DOS RESULTADOS

$$\text{HDL Colesterol (g/l)} = D \times f \quad f = \frac{0,762}{P}$$

$$0,762 = 2 \text{ g/l} \times \frac{V_{F_E}}{V_A} \times \frac{V_{R_E}}{V_{R_P}} \times \frac{V_P}{V_E}$$

onde

$V_{F_E}$  = volume final de extrato = 0,7 ml

$V_A$  = volume de amostra processada = 0,2 ml

$V_{R_E}$  = volume de reação com extrato = 2,2 ml

$V_{R_P}$  = volume de reação com Padrão = 2,02 ml

$V_P$  = volume de Padrão na reação = 0,020 ml

$V_E$  = volume de extrato na reação = 0,2 ml

Se são utilizados volumes de Reagente diferentes de 2 ml o fator 0,762 varia e deve ser calculado novamente e substituído na fórmula  $V_{R_E}$  e  $V_{R_P}$ .

#### VALORES DE REFERÊNCIA

O painel de expertos do National Cholesterol Education Program (NCEP) fornece os seguintes valores de HDL colesterol:

0,40-0,60 g/l

É recomendável que cada laboratório estabeleça seus próprios valores de referência. Valores maiores de 0,40 g/l

consideram-se recomendáveis, no entanto, em aqueles casos que os valores se encontrarem acima de 0,60 g/l consideram-se de proteção. Os valores de HDL colesterol por baixo de 0,40 g/l consideram-se como índice de risco para doenças cardíacas coronárias.

#### LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- Vide Substâncias interferências conhecidas em AMOSTRA.
- A exatidão e precisão dependem fundamentalmente da observação das condições de precipitação.
- Amostras com triglicerídeos superiores a 10 g/l, podem apresentar dificuldades para a precipitação dividida, produzindo sobrenadantes turvos ou a lipoproteínas flutuando sobre a superfície. Porém, diluir a amostra em 1/2 com solução fisiológica e repetir a precipitação. O resultado obtido deverá ser multiplicado por 2.

#### DESEMPENHO

**a) Reprodutibilidade:** processando duplicatas de uma mesma amostra em um mesmo dia, obtiveram-se o seguinte:

Nível	D.P.	C.V.
0,32 g/l	± 0,011 g/l	3,4 %
0,68 g/l	± 0,024 g/l	3,5 %

**b) Linearidade:** a reação é linear até 5 g/l.

**c) Limite de detecção:** em espectrofotômetro, para uma variação de absorvância de 0,001 D.O., a mudança mínima de concentração detectável será de 0,0063 g/l de colesterol.

#### APRESENTAÇÃO

- 100 ml (Cód. 1220108).

#### REFERÊNCIA

- Castelli, W.; Levitas I. - Current Prescribing 6/77:39 (1977).
- Gordon, T. - Am. J. Med. 62:707 (1977).
- Lopes-Virela, M.F. et al. - Clin. Chem. 23/5:882 (1977).
- Coniglio, R. I. - Acta Bioq. Clin. Latinoam. XXIII/2:201, 1989.
- Cooper, C. - National Heart and Lung Institute, NIH (USA), 1974.
- Expert Panel of National Cholesterol Education Program - JAMA 285/19:2486 (2001).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4<sup>th</sup> ed., 2001.



# HDL Colesterol

*FT*

Precipitating reagent (phosphotungstic acid) for HDL-cholesterol's separation in serum or plasma

## SUMMARY

Plasma lipoproteins are spherical particles containing varying amounts of cholesterol, triglycerides, phospholipids and proteins.

Phospholipids, free cholesterol and proteins constitute the outer surface of the lipoprotein particle, while the inner core contains mostly esterified cholesterol and triglycerides. Lipoproteins solubilize and transport cholesterol into the bloodstream.

Lipoproteins classification is based on its density which depends on the proportion of protein and lipid involved. Classes are: chylomicron, very-low-density lipoproteins (VLDL), low-density lipoproteins (LDL) and high-density lipoproteins (HDL). Numerous clinical studies have shown that the different lipoprotein classes have diverse effects on coronary heart disease risk.

The main role of HDL in lipid metabolism is the uptake and transport of cholesterol from peripheral tissues to the liver through a process known as reverse cholesterol transport (cardioprotective mechanism). Low HDL-cholesterol is associated with a high risk of coronary heart disease. Therefore, the determination of HDL-cholesterol is a useful tool for identification high-risk patients.

## PRINCIPLE

High-density lipoproteins (HDL) are selectively separated by precipitating the low and very-low-density lipoproteins (LDL and VLDL) with phosphotungstic acid in magnesium ions presence. HDL remain in the supernatant. Cholesterol associated to HDL is determined by the enzymatic system cholesterol-oxidase/peroxidase with Trinder colorimetry (Phenol/4-Amino-phenazone).

## PROVIDED REAGENTS

**A. Reagent A** (Precipitating Reagent): 0.44 mmol/l phosphotungstic acid and 20 mmol/l magnesium chloride solution.

## NON-PROVIDED REAGENTS

Wiener lab.'s **Colestat enzimático**, **Colestat enzimático AA** or **Colestat enzimático AA líquida**.

## INSTRUCTIONS FOR USE

**Reagent A:** ready to use.

## WARNINGS

The Reagent is for "in vitro" diagnostic use. Use the reagents according to the working procedures for clinical laboratories.

The reagents and samples should be discarded according to the local regulations in force.

## STABILITY AND STORAGE INSTRUCTIONS

The Provided Reagent is stable at room temperature (< 25°C) until the expiration date stated on the box.

## INSTABILITY OR DETERIORATION OF REAGENTS

Any trace of bacterial contamination may indicate reagent deterioration.

## SAMPLE

Serum or plasma

**a) Collection:** obtain the sample in the usual way.

**b) Additives:** if plasma is used, collect only with heparin.

**c) Known interfering substances:** anticoagulants other than heparin and bilirubin over 50 mg/l interfere. See Young, D.S. in References for effect of drugs on the present method.

**d) Stability and storage instructions:** separate serum within one hour from extraction. The Lipid Research Clinics recommend to refrigerate the sample until the test is performed. The conservation of the samples at room temperature alters their lipoprotein composition, even before 24 hours. Some authors mention that sample stability is maintained for up to 3 days at 4°C and it is extended when they are frozen. However, there is a great variability between different samples, therefore, it is recommended to keep them at 2-10°C and performe the test within 24 hours.

## REQUIRED MATERIAL (non-provided)

- Spectrophotometer or photocolorimeter.
- Micropipettes and pipettes for measuring the stated volumes
- Kahn tubes.
- Spectrophotometric cuvettes.
- Water bath at 37°C.
- Stopwatch.

## ASSAY CONDITIONS

- Wavelength: 505 nm in spectrophotometer or 490-530 nm in photocolorimeter with green filter.
- Reaction temperature: 37°C
- Reaction time: 35 minutes
- Sample volume: 200 ul
- Reagent A volume: 500 ul
- Supernatant volume: 200 ul
- Working Reagent volume of **Colestat enzimático**, **Colestat enzimático AA** or **Colestat enzimático AA líquida**: 2 ml
- Final reaction volume: 2.2 ml

## PROCEDURE

In a Kahn tube adds 200 ul sample and 500 ul Reagent A. Homogenize by shaking (not by inversion) for 20 seconds and let repose for 10 minutes at room temperature. Centrifuge 15 minutes at 3000 rpm or 2 minutes at 12,000 rpm. Use clean supernatant as sample.

In three tubes labeled B (Blank), S (Standard) and U (Unknown) place:

	B	S	U
Supernatant	-	-	200 ul
Standard	-	20 ul	-
Working Reagent	2 ml	2 ml	2 ml

When Working Reagent of **Colesterol enzimático AA** or **Colestat enzimático AA líquida** is used, mix and incubate for up to 5 minutes at 37°C or 15 minutes at 37°C when Working Reagent of **Colestat enzimático** is used. Then, take the tubes out of the bath and bring them to room temperature.

Read absorbance at 505 nm in spectrophotometer or at 490-530 nm in photocolimeter with green filter, setting the instrument to zero with the Blank.

## STABILITY OF FINAL REACTION

The reaction color is stable for up to 2 hours, thus the absorbance must be measure within that period.

## CALCULATIONS

$$\text{HDL Cholesterol (g/l)} = U \times f \quad f = \frac{0.762}{S}$$

$$0.762 = 2 \text{ (g/l)} \times \frac{FV_E}{V_S} \times \frac{RV_E}{RV_{Std}} \times \frac{V_{Std}}{V_E}$$

$FV_E$  = extract final volume = 0.7 ml

$V_S$  = processed sample volume = 0.2 ml

$RV_E$  = reaction volume with extract = 2.2 ml

$RV_{Std}$  = reaction volume with Standard = 2.02 ml

$V_{Std}$  = Standard volume in the reaction = 0.020 ml

$V_E$  = extract volume in the reaction = 0.2 ml

If Reagent volumes other than 2 ml are used, the 0.762 factor varies and must be calculated again, replacing  $VR_E$  and  $VR_{Std}$  in the formula.

## REFERENCE VALUES

The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel provided the following reference values:

0.40 - 0.60 g/l

It is recommended that each laboratory establishes its own reference values. However, values over 0.40 g/l are recommended and the ones over 0.60 g/l have been regarded as protective. On the contrary, HDL-cholesterol values below 0.40 g/l is considered as risk indicator of coronary heart disease.

## PROCEDURE LIMITATIONS

- See Known interfering substances under SAMPLE.
- The accuracy and precision of the determination mainly depend on following the precipitation conditions.
- Samples with triglycerides above 10 g/l may difficult the precipitation yielding turbid supernatants or a lipoprotein layer floating on the surface. In that case, dilute the sample 1:2 with saline solution and repeat the precipitation. The obtained result must be multiplied by 2.

## PERFORMANCE

**a) Reproducibility:** processing replicates of one sample on the same day, the following results were obtained:

Level	S.D.	C.V.
0.32 g/l	± 0.011 g/l	3.4 %
0.68 g/l	± 0.024 g/l	3.5 %

**b) Linearity:** the reaction is linear up to 5 g/l.

**c) Detection limit:** depends on the spectrophotometer used. For a 0.001 O.D. reading, the minimum visible change of concentration will be of approximately 0.0063 g/l.

## WIENER LAB. PROVIDES

- 100 ml (Cat. 1220108).

## REFERENCES

- Castelli, W.P.; Levitas, I.M. - Current Prescribing 6/77:39, 1977.
- Gordon, T. - Am. J. Med. 62:707 (1977).
- Lopes-Virela, M.F. et al. - Clin. Chem. 23/5:882, 1977.
- Coniglio, R.I. - Acta Bioq. Clin. Latinoam. XXIII/2:201, 1989.
- Cooper, C. et al. - National Heart and Lung Institute, NIH (USA), 1974.
- Expert Panel of National Cholesterol Education Program - JAMA 285/19:2486 (2001).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4<sup>th</sup> ed., 2001.





# HDL Cholesterol

FT

Odczynnik strąceniowy (kwas fosforowolframowy) oddzielania  
HDL- cholesterolu w surowicy krwi lub osoczu

Nr kat. 1220108

## WSTĘP

Lipoproteiny osocza to kuliste cząsteczki zawierające różne ilości cholesterolu, trójglicerydów, fosfolipidów i białek. Fosfolipidy, wolny cholesterol i białka tworzą zewnętrzną powierzchnię cząsteczki lipoprotein, natomiast wewnętrzny rdzeń składa się głównie z estryfikowanego cholesterolu z trójglicerydami. Cząsteczki te rozpuszczają i transportują cholesterol do strumienia krwi. Odpowiedni stosunek białek i tłuszczów odpowiedzialny jest za gęstość lipoprotein i jest podstawą do ich klasyfikacji na: chylomikrony, lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości (very-low-density lipoproteins VLDL), o niskiej gęstości (low-density lipoproteins LDL) oraz o wysokiej gęstości (high-density lipoproteins HDL). Wiele klinicznych badań wykazało, że różne klasy lipoprotein mają znaczący i zróżnicowany wpływ na ryzyko choroby niedokrwiennej serca.

Główną rolą HDL w metabolizmie tłuszczów jest wychwyt i transport cholesterolu z tkanek obwodowych do wątroby w tzw. procesie transportu zwrotnego cholesterolu (mechanizm kardioprotekcyjny). Niski poziom cholesterolu HDL jest związany ze zwiększonym ryzykiem choroby niedokrwiennej serca. Dlatego oznaczenie poziomu cholesterolu HDL w surowicy krwi jest użytecznym narzędziem w rozpoznawaniu grup pacjentów wysokiego ryzyka.

## ZASADA DZIAŁANIA

Lipoproteiny o wysokiej gęstości (HDL) są selektywnie oddzielane przez strącenie lipoprotein o niskiej i bardzo niskiej gęstości (LDL i VLDL) w reakcji z kwasem fosforowolframowym w obecności jonów magnezu. HDL pozostaje w nadsączu i należy go oddzielić przez odwirowanie. Następnie oznaczenie dokonuje się metodą enzymatyczną układem oksydazy cholesterolowej i peroksydazy przy zastosowaniu kolorymetrii Trindera (fenol/ 4-aminofenazon).

## DOSTARCZANE ODCZYNNIKI

**A. Odczynnik A (Odczynnik strąceniowy):** 0,44 mmol/l kwas fosforowolframowy i 20 mmol/l roztworu chlorku magnezu.

## NIEDOSTARCZANE ODCZYNNIKI

Colestat enzymático, Colestat enzymático AA lub Colestat enzymático AA líquida Wiener lab.

## INSTRUKCJA UŻYCIA

**Odczynnik A:** gotowy do użycia.

## OSTRZEŻENIA

Odczynnik diagnostyczny do zastosowania "in vitro".

Stosować odczynniki zgodnie z procedurami dla laboratoriów klinicznych.

Odczynniki i materiał badany odrzucać zgodnie z lokalnymi przepisami.

## TRWAŁOŚĆ I WARUNKI PRZECHOWYWANIA

Dostarczane odczynniki są trwałe w temperaturze pokojowej (< 25°C) do końca daty ważności umieszczonej na opakowaniu.

## BRAK TRWAŁOŚCI I POGORSZENIE JAKOŚCI ODCZYNNIKÓW

Jakikolwiek ślad nadkażenia bakteryjnego może wskazywać na pogorszenie odczynnika.

## MATERIAŁ BADANY

Surowica krwi lub osocze

**a) Pobranie:** pobrać materiał badany w klasyczny sposób.

**b) Substancje dodatkowe:** jeśli materiałem jest osocze zaleca się zastosowanie wyłącznie heparyny jako antykoagulantu.

**c) Znane interakcje:** antykoagulant inny niż heparyna i bilirubina powyżej 50 mg/l.

Zobacz źródło: Young, D.S. w sprawie wpływu leków w tej metodzie.

**d) Trwałość i instrukcja przechowywania:** oddzielić surowicę w ciągu godziny od pobrania. Zgodnie z zaleceniami The Lipid Research Clinics schłodzić próbkę przed wykonaniem testu. Przechowywanie materiału badanego w temperaturze pokojowej prowadzi do zmiany składu lipoprotein nawet przed upływem 24 godzin.

Niektórzy autorzy sugerują trwałość zamrożonego materiału do 3 dni w temperaturze 4°C. Jednak ze względu na znaczące odmienności pomiędzy różnymi próbkami materiału zaleca się przechowywanie po schłodzeniu i analizie przed upływem 24 godzin.

## WYMAGANE MATERIAŁY I SPRZĘT (niedostarczane)

- Spektrofotometr lub fotokolorometr.
- Mikropipety i pipety do pomiaru określonej objętości.
- Probówki Kahna.
- Kuwety spektrofotometryczne.
- Łażnia wodna o temp. 37°C.
- Stoper.

## WARUNKI DLA PRZEPROWADZENIA TESTU

- Długość fali: 505 nm dla spektrofotometru lub 490-530 nm w fotokolorymetrze z zielonym filtrem.
- Temperatura reakcji: 37°C

- Czas reakcji: 35 minut
- Objętość materiału badanego: 200 ul
- Objętość Odczynnika A: 500 ul
- Objętość nadsączu: 200 ul
- Objętość Odczynnik A Roboczego Colestat enzymático, Colestat enzymático AA lub Colestat enzymático AA líquida: 2 ml
- Objętość reakcji końcowej: 2,2 ml

#### PROCEDURA

Próbówką Kahna odmierzyć 200 ul materiału badanego i dodać 500 ul Odczynnik A. Homogenizować wstrząsając (ale nie przez odwrócenie) przez 20 sekund i odstawić na 10 minut w temperaturze pokojowej. Odwirować przez 15 minut przy 3000 obr./min. lub 2 minuty przy 12 000 obr./min. Zastosować czysty nadsącz jako materiał badany.

W trzech próbkach oznaczonych B (Blank - Próba ślepa), S (Standard - Próba wzorcowa) oraz U (Unknown - Nieznany materiał badany) umieścić:

	B	S	U
<b>Nadsącz</b>	-	-	200 ul
<b>Próba wzorcowa</b>	-	20 ul	-
<b>Odczynnik Roboczy</b>	2 ml	2 ml	2 ml

Wymieszać i inkubować przez 5 minut w temp. 37°C jeśli jako Odczynnik Roboczy zastosowano Colesterol enzymático AA lub Colestat enzymático AA líquida, lub 15 minut w temp. 37°C jeśli jako Odczynnik roboczy zastosowano Colestat enzymático. Wyjąć z łaźni wodnej i ochłodzić. Odczytać absorbancję w spektrofotometrze przy 505 nm lub w fotokolorymetrze z zielonym filtrem przy 490-530 nm, ustawiając aparat na zero na Próbie Ślepej.

#### TRWAŁOŚĆ REAKCJI KOŃCOWEJ

Barwa reakcji jest trwała przez 2 godziny, w tym okresie czasu należy odczytać absorbancję.

#### OBLICZENIA

$$\text{HDL Cholesterol (g/l)} = U \times f \quad \text{gdzie } f = \frac{0,762}{S}$$

$$0,762 = 2 \text{ (g/l)} \times \frac{FV_E}{V_S} \times \frac{RV_E}{RV_{Std}} \times \frac{V_{Std}}{V_E}$$

$FV_E$  (extract final volume) = końcowa objętość ekstraktu = 0,7 ml

$V_S$  (processed sample volume) = objętość przetwarzanej próbki = 0,2 ml

$RV_E$  (reaction volume with extract) = objętość reakcji z ekstraktem = 2,2 ml

$RV_{Std}$  (reaction volume with Standard) = objętość reakcji z próbą wzorcową = 2,02 ml

$V_{Std}$  (Standard volume in the reaction) = objętość próby wzorcowej w reakcji = 0,020 ml

$V_E$  (extract volume in the reaction) = objętość ekstraktu w reakcji = 0,2 ml

Jeżeli objętość odczynnika jest inna niż 2 ml, współczynnik 0,762 zmienia się i należy go wyznaczyć powtórnie zastępując  $RV_E$  oraz  $RV_{Std}$  w równaniu.

#### WARTOŚCI REFERENCYJNE

Zespół ekspertów The National Cholesterol Education Program (NCEP) ustalił następujący zakres referencyjny: 0,40 - 0,60 g/l

Zaleca się dla każdego laboratorium ustalenie własnych wartości referencyjnych. Jakkolwiek wartości powyżej 0,40 g/l są zalecane a powyżej 0,60 g/l są uznawane za kardioprotekcyjne. Z drugiej strony wartości cholesterolu HDL poniżej 0,40 g/l uznaje się za niezależny czynnik ryzyka choroby niedokrwiennej serca.

#### OGRANICZENIA PROCEDURY

- Zobacz znane interakcje w rozdziale MATERIAŁ BADANY.
- Dokładność i precyzja oznaczenia zależy głównie warunków reakcji strącania.
- Próbki z trójglicerydemią powyżej 10 g/l mogą utrudniać frakcjonowaną precypitację dając mętny nadsącz lub pływającą na powierzchni warstwę lipoprotein. W tym przypadku rozcieńczyć materiał badany 1:2 solą fizjologiczną i powtórzyć strącenie. Otrzymane wyniki należy pomnożyć przez 2.

#### CHARAKTERYSTYKA TESTU

**a) Powtarzalność:** badanie tej samej próbki powtórzono tego samego dnia i otrzymano następujące wyniki:

Poziom	S.D.	C.V.
0,32 g/l	± 0,011 g/l	3,4 %
0,68 g/l	± 0,024 g/l	3,5 %

**b) Linijność:** reakcja jest linijna do poziomu 5 g/l.

**c) Granica wykrywalności:** zależy od użytego spektrofotometru. Dla odczytu 0.001 O.D. minimalna dostrzegalna zmiana stężenia wynosi ok. 0,0063 g/l.

#### WIENER LAB. DOSTARCZA

- 100 ml (Nr kat. 1220108)


#### ŹRÓDŁA


- Castelli, W.; Levitas I. - Current Prescribing 6/77:39 (1977).
- Gordon, T. - Am. J. Med. 62:707 (1977).
- Lopes-Virela, M.F. et al. - Clin. Chem. 23/5:882 (1977).
- Coniglio, R. I. - Acta Bioq. Clin. Latinoam. XXIII/2:201, 1989.
- Cooper, C. - National Heart and Lung Institute, NIH (USA), 1974.
- Expert Panel of National Cholesterol Education Program - JAMA 285/19:2486 (2001).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4<sup>th</sup> ed., 2001.





## SÍMBOLOS // SÍMBOLOS // SYMBOLS // OZNACZENIA

Los siguientes símbolos se utilizan en todos los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab. // Os seguintes símbolos são utilizados nos kits de reagentes para diagnóstico da Wiener lab. // The following symbols are used in the packaging for Wiener lab. diagnostic reagents kits. // Następujące symbole są zastosowane na opakowaniach zestawów odczynników diagnostycznych.


 Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro" // Este produto preenche os requisitos da Diretiva Europeia 98/79 CE para dispositivos médicos de diagnóstico "in vitro" // This product fulfills the requirements of the European Directive 98/79 EC for "in vitro" diagnostic medical devices // Ten produkt spełnia wymagania Dyrektywy Europejskiej 98/79 EC dla wyrobów medycznych używanych do diagnozy "in vitro"

 Representante autorizado en la Comunidad Europea // Representante autorizado na Comunidade Europeia // Authorized representative in the European Community // Autoryzowany przedstawiciel we Wspólnocie Europejskiej

 Uso diagnóstico "in vitro" // Uso médico-diagnóstico "in vitro" // "In vitro" diagnostic medical device // Wyrób do diagnostyki "in vitro"

 Contenido suficiente para <n> ensayos // Conteúdo suficiente para <n> testes // Contains sufficient for <n> tests // Zawartość wystarczająca dla <n> badań

 Fecha de caducidad // Data de validade // Use by // Użyć przed


 Límite de temperatura (conservar a) // Limite de temperatura (conservar a) // Temperature limitation (store at) // Ograniczenie dopuszczalnych temperatur

 No congelar // Não congelar // Do not freeze // Nie zamrażać

 Riesgo biológico // Risco biológico // Biological risks // Ryzyko biologiczne

 Volumen después de la reconstitución // Volume após a reconstituição // Volume after reconstitution // Objętość po rozpuszczeniu

 Contenido // Conteúdo // Contents // Zawartość

 Número de lote // Número de lote // Batch code // numer serii

 Elaborado por // Elaborado por // Manufactured by // Wytwórca

 Nocivo // Nocivo // Harmful // Substancja szkodliwa

 Corrosivo / Cáustico // Corrosivo / Cáustico // Corrosive / Caustic // Substancja żrąca

 Irritante // Irritante // Irritant // Substancja drażniąca


 Consultar instrucciones de uso // Consultar as instruções de uso // Consult instructions for use // Przed użyciem zapoznać się z instrukcją


 Calibrador // Calibrador // Calibrator // Kalibrator

 Control // Controle // Control // Próba kontrolna

 Control Positivo // Controle Positivo // Positive Control // Próba kontrolna dodatnia

 Control Negativo // Controle Negativo // Negative Control // Próba kontrolna ujemna

 Número de catálogo // Número de catálogo // Catalog number // Numer katalogowy

 Wiener Laboratorios S.A.I.C.  
Riobamba 2944  
2000 - Rosario - Argentina  
<http://www.wiener-lab.com.ar>  
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola  
Bioquímica  
Producto Autorizado A.N.M.A.T.  
Cert. N°: 1344/96



**Wiener lab.**

2000 Rosario - Argentina