



HDL Colesterol

Reactivo Precipitante

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

La proporción relativa de proteína y lípido determina la densidad de estas lipoproteínas.

La función principal de las lipoproteínas de alta densidad o HDL (high density lipoprotein) 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 sulfato de dextrán de PM 50.000 en presencia de iones Mg^{++} .

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

REACTIVOS PROVISTOS

A. Reactivo A: solución de sulfato de dextrán (PM 50.000) 0,032 mmol/l.

B. Reactivo B: solución de cloruro de magnesio 1,5 M.

REACTIVOS NO PROVISTOS

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

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Reactivo Precipitante (A+B); preparación: en el frasco provisto, medir 2,5 ml de Reactivo A y 2,5 ml de Reactivo B. Mezclar por inversión y colocar fecha de preparación. Pueden prepararse cantidades menores de acuerdo a las necesidades, respetando la proporción 1 + 1 para ambos reactivos.

PRECAUCIONES

Los reactivos son 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

Reactivos Provistos: son estables a temperatura ambiente hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

Reactivo Precipitante: es estable 6 meses a temperatura ambiente o 1 año en refrigerador (2-10°C) a partir de la fecha de preparación.

INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Cualquier indicio de contaminación bacteriana puede ser signo de deterioro de los reactivos.

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. El almacenamiento o 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.
- Tubos de Kahn.
- Tubos o cubetas espectrofotométricas.
- 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: 45 minutos
- Volumen de muestra: 500 ul
- Volumen de Reactivo Precipitante: 50 ul
- Volumen de Sobrenadante: 100 ul
- Volumen de Reactivo de Trabajo de **Colestat enzimático** o **Colestat enzimático AA/líquida**: 2 ml
- Volumen final de reacción: 2,1 ml

PROCEDIMIENTO

En un tubo de Kahn medir 0,5 ml (500 ul) de muestra, y agregar 50 ul de Reactivo Precipitante. Homogeneizar agitando (sin invertir) durante 20 segundos y dejar 30-40 minutos en refrigerador (2-10°C) o 15 minutos en baño de agua a la misma temperatura. No colocar en congelador. Centrifugar 15 minutos a 3000 r.p.m. Usar el sobrenadante límpido como muestra.

En 3 tubos marcados B, S y D colocar:

	B	S	D
Sobrenadante	-	-	100 ul
Standard	-	20 ul	-
Reactivo de Trabajo	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

$$\text{HDL Colesterol (g/l)} = D \times f \quad f = \frac{0,457}{S}$$

$$0,457 = 2 \text{ (g/l)} \times \frac{V_{F_E}}{V_M} \times \frac{V_{R_E}}{V_{R_S}} \times \frac{V_S}{V_E} \quad \text{donde:}$$

V_{F_E} = volumen final de extracto = 0,55 ml

V_M = volumen de muestra procesada = 0,5 ml

V_{R_E} = volumen de reacción con extracto = 2,1 ml

V_{R_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 = 0,1 ml

Si se emplean volúmenes de Reactivo diferentes de 2 ml el factor 0,457 varía y debe ser calculado nuevamente, reemplazando en la fórmula V_{R_E} y V_{R_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 de la determinación dependen fundamentalmente de la observación de las condiciones de precipitación, por lo que los tiempos y temperaturas establecidos, si bien no requieren un control riguroso, deben ser respetados.

Cuando el HDL colesterol no puede separarse por completo en una centrífuga común debido a niveles elevados de triglicéridos puede efectuarse la determinación de la siguiente manera: seguir las instrucciones indicadas en PROCEDIMIENTO hasta la incubación a 4-10°C y luego de la misma, colocar la mezcla de reacción en tubos capilares y centrifugar en centrífugas de microhematocrito a 10.000 r.p.m. durante 5 minutos. Cortar el capilar desechando el precipitado y utilizar el sobrenadante límpido para la prueba.

PERFORMANCE

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

Nivel	D.S.	C.V.
0,29 g/l	± 0,011 g/l	3,8 %
0,63 g/l	± 0,023 g/l	3,7 %

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

Equipo para procesar 100 muestras (Cód. 1220103).

BIBLIOGRAFIA

- Castelli, W. P.; Levitas I. M. - Current Prescribing 6/77:39 (1977).
- Cooper, C. et al. - National Heart and Lung Institute, (USA) (1974).
- Gordon, T. - Am. J. Med. 62:707 (1977).
- Kostner, G.M. et al. - Clin. Chem. 25/6:939 (1979).
- Stanbury, J. B.; Wyngaarden, J. B.; Fredrickson, D. S. - "The Metabolic Basis of Inherited Disease", Mc Graw - Hill Book Co., 2ª ed., 1966.
- Coniglio, R. I. - Acta Bioq. Clin. Latinoam. XXIII/2:201, 1989.
- Expert Panel of National Cholesterol Education Program - JAMA 285/19:2486 (2001).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4ª ed., 2001.

Símbolos

Los siguientes símbolos se utilizan en todos los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab.



Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"



Elaborado por:



Representante autorizado en la Comunidad Europea



Nocivo



Uso diagnóstico "in vitro"



Corrosivo / Caústico



Contenido suficiente para <n> ensayos



Irritante



Fecha de caducidad



Consultar instrucciones de uso



Límite de temperatura (conservar a)



Calibrador



No congelar



Control



Riesgo biológico



Control Positivo



Volumen después de la reconstitución



Control Negativo




Contenido



Número de lote



Número de catálogo

 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.
Disp. N°: 5984/83-319/00



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina