ANEXOS

ANEXOS

A-ÁCIDO ÚRICO

PRINCÍPIO: O ácido úrico é oxidado enzimaticamente pela uricase A alantoina com produção de dióxido de carbono e Água oxigenada, a qual, em união com o reativo peroxidase/4-amino-fenazona e fenol, gera uma quinomina vermelha.

AMOSTRA: soro.

REAGENTES: Padrão de 10 mg/dl

Uricase

Reativo 4-AF/POD

Reativo Fenol.

TÉCNICA: Reativo de trabalho: 80 ml de água destilada + 10 ml de reativo 4-AF/POD + 10 ml do reativo de fenol.

tubos	B	P	D
padrão		50,0 ul	
amostra			50,0 ul
reat.trabalho	2,5ml	2,5 ml	2,5 ml

Misturar e incubar no B.M. 37 o C por 15 minutos. Ler em espectrofotômetro 520 nm

CÁLCULO: 10/ D.O.padrão x D.O. amostra.

VALORES NORMAIS: homens 2,5-6,0 mg/di

mulheres 2,0-5,0 mg/di

mmo1/1= mg/di x 0,0595.

B- LIPÍDEOS TOTAIS

PRINCÍPIO: Determinação pelo sulfofosfovanílico

AMOSTRA: soro.

REAGENTES: sol. padrão 800 mg/dl

reat.fosfovanílico.

ácido sulfúrico concentrado.

TÉCNICA:

	branco	padrão	amostra
amostra			100,0 ul.
padrão		100,0 ul.	
ác.sulfúrico	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml.
Misturar energicamente, e colocar em B.M. fervente por 10 minutos. Esfriar.			
	branco	padrão	amostra
amostra/ac.sul.			100,0 ul
padrão/ac.sulf.		100,0 ul	
fosfovanílico	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml.

Agitar energicamente e colocar em repouso por 30 minutos na obscuridade.

Ler contra o branco de reagentes. Comprimento de onda 535 nm.

CÁLCULO: amostra/padrão x 800 = mg/di

NORMAL: 500 a 750 mg/di.

C- TRIGLICÉRIDES

PRINCÍPIO: A hidrólise dos triglicérides é catalisada por uma lipase para produção de glicerol e ácidos graxos livres. O glicerol gerado é depois fosforilado por adenosina-5-trifosfato em presença de glicerolquinase resultando glicerol-3-fosfato. Este sofre oxidação, catalisada pela enzima L-glicerol-3-fosfato oxidase produzindo água oxigenada. Um extenso cromógeno vermelho é produzido por peroxidase que catalisa a copulação oxidativa da 4-aminoantipirina e 2-hidroxi-3-5-Diclorobenzenosulfonato de sódio com água oxigenada.

Teste enzimático colorimétrico.

AMOSTRA: soro ou plasma.

REAGENTES: sol. padrão 200 mg/dl ou 2,29 mmol/l

solução reativa: tampão Tris pH 7,6 50 mmol/l
ATP 2,0 mmol/l
GK 100 U/l
GPO 1000 U/l
POD 350 U/l
4AF 2,0 mmol/l
3-5-HDCBS 1,0 mmol/l
lipases >5.000 U/l

TÉCNICA:

	branco	padrão	amostra
amostra			10,0 ul
padrão		10,0 ul	
sol.reat.	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml

Agitar bem e incubar 15 minutos a 37°C.

Ler contra o branco. Comprimento de onda 505 nm.

CÁLCULO: amostra/padrão x 200 = mg/dl.

amostra/padrão x 2,29 = mmol/l

NORMAL: normal: até 200 mg / dl.

risco moderado: 200 a 500 mg/dl.

alto risco: acima de 500 mg/dl.

D- LDL - COLESTEROL

REATIVOS:

1- reativo precipitante

Solução 10 g/l de s fato de polivinilo dissolvido em polietilenglicol (PM600) a 25 %, 6,7.

2- reativo de trabalho de Colestat enzimático Wiener lab.

3- padrão LDL 62,4 mg/dl

AMOSTRA: soro.

TÉCNICA:

a- precipitação:

reativo precipitante

100 ul

SOLO

200 ul

Misturar agitando por 20 segundos e deixar 15 minutos a 20-25°C.

Centrifugar a 3.000 r.p.m. por 15 min.

b-determinação do colesterol LDL:

	branco	padrão	amostra
sobrenadante			100 ul
padrão		20ul	
solução de trabalho	2 ml	2 ml	2 ml.

Misturar e incubar 15 minutos a 37°C. Ler em 505 nm.

CÁLCULO: Colesterol total - (D x
f= 62,4 / padrão

NORMAL: normal: até 130 mg/di.
risco moderado: 130 a 160 mg/di
alto risco: acima de 160 mg/di

E- GLICOSE

FUNDAMENTO: A glicose forma com a o-toluidina em solução de Ácido acético a quente, um produto de cor verde.

REAGENTES: Sol. de o-toluidina 800 mmol/l em ácido acético.
Sulfato de zinco a 10 %.
Solução de NaOH a 0,5 N.
Solução padrão de glicose a 100 mg/di.
Anticoagulante de fluoreto-oxalato.

AMOSTRA: Sangue total.

TÉCNICA: Tomar 3 frascos de desproteinização e numerar "B", "P", e "D". Colocar 8 ml de água deionizada no frasco "B", 7 ml de água deionizada nos frascos "D" e "P". Ao frasco "D" adicionar 1 ml de sangue total e homogeneizar.

Ao frasco "P" adicionar 1 ml de solução padrão de glicose a 100 mg/di e homogeneizar.

Adicionar a todos os frascos 1 ml de solução de NaOH a 0,5 N e agitar e em seguida adicionar 1 ml de sulfato de zinco a 10 % gota a gota e agitar energicamente.

Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos.

Tomar 1 ml do filtrado e adicionar 2,5 ml de solução de orto-toluidina e levar ao banho fervente por 12 minutos. Esfriar em água corrente e ler contra o branco da reação em 630 nm, cubas 12 x 75.

CÁLCULO: amostra/padrão X 100 = MG/DL

NORMAL: 65 a 100 mg %

F- **COLESTEROL** Método colorimétrico enzimático de Siedel, J.

AMOSTRA: Soro ou plasma com heparina ou EDTA.

REATIVOS:

tampão tris	100 mmol/l
aspartato de magnésio	50 mmol/l
4-aminofenazona	1 mmol/l
colato sódico	10 mmol/l
fenol	6 mmol/l
3,4 diclorofenol	4 mmol/l
éter poliglicólico (a.graxo)	0,3%
coesterolesterase	>0,4 U/ml
coesteroxidase	>0,25 U/ml
peroxidase	0,2 U/l

Dissolver em 100 ml de Água destilada.

TÉCNICA:

	branco	desconhecido
amostra		0,02 ml
sol.reativa	2,0 ml	2,0 ml

Misturar e incubar por 10 minutos a 25°C ou 5 min. a 37°C.

Ler em 500 nm (470-560 nm)

CALCULO: $C = 575 \times A$ (amostra) mg/ dl.

$C = 14,9 \times A$ (amostra) mmol/l.

NORMAL:

Valor desejável: até 200 mg / dl

Valores limítrofes: entre 200 e 240 mg / dl.

Valores elevados: acima de 240 mg / dl.

H- HDL-colesterol

1

FUNDAMENTO: Qui omicrons, VLDL, LDL, são precipitados pela adição de ácido fosfotungstico e íons magnésio. A centrifugação deixará apenas o HDL no sobrenadante. O colesterol é medido enzimaticamente.

REAGENTES: ácido fosfotungstico 0,55 mmol/l
cloreto de magnésio 25 mmol/l

AMOSTRA: soro ou plasma.

TÉCNICA:

a- precipitação

amostra

agente precipitante

500ul
1.000 ul

Misturar e incubar 10 minutos em temp. ambiente. Centrifugar a 4.000 r.p.m. por 10 min.

b- dosagem do colesterol

	branco	desconhecido
água destilada	200,0 ul	
sobrenadante		200,0 ul.
solução reagente	2,0 ml	2,0 ml.

Misturar e incubar 10 min. a 20-25° C.

Ler contra o branco da reação em 500 nm.

CALCULO: amostra x 187,9 = mg/dl

amostra x 4,86 = tmo1/1

NORMAL: homem: 35,0 a 45,0 mg / dl.

mulher: 40,0 a 55,0 mg/dl.

H- APOPROTEINA AI

REAGENTES: Placas de imunodifusão radial BEHRING para a dosagem de apoproteína AI.

Reagente para precipitação.

AMOSTRA: Soro conservado em geladeira por no máximo 8 dias.

PREPARAÇÃO: Deixar as placas em temperatura ambiente por 5 minutos para evaporar a condensação.

TÉCNICA: Diluir o soro padrão e os soros dos pacientes com o reagente complementar de precipitação. Aguardar 30 minutos, centrifugar a 3000 rpm. Aplicar 5 ul do sobrenadante dos padrões diluídos a 1:1, 1:2 e 1:4 nos orifícios de 1 a 3 e dos soros dos pacientes nos orifícios de 4 a 12 utilizando dispenser Behring.

LEITURA: Medir após 72 horas o diâmetro do halo de precipitação.

NORMAL: 0,90 a 2,10 g/litro.

I- APOPROTEINA B

REAGENTE: Placas de Imunodifusão radial Behring NorPartigen para apoproteína B.

AMOS RA: Soro não congelado, conservado em geladeira.

PREPARAÇÃO: Deixar as placas 5 minutos A. temperatura ambiente para evaporar a condensação.

TÉCNICA: Depositar 5 ul de soro controle diluído 1:1, 1:2 e 1:4 nos orifícios 1 a 3 e 5 ul de soro dos pacientes nos orifícios de 4 a 12.

LEITURA: Medir o diâmetro dos halos de precipitação após 4 dias.

NORMAL: 0,6 A 1,5 g/litro.

J-LIPOPROTENA(a)

MATERIAL: Kit da Pharmacia apo(a) RIA

AMOSTRA: Soro.

PREPARAÇÃO: Os soros dos pacientes e controle deverão ser preparados como segue:

Soro/controle	50 ul
Solução de pré-tratamento	50 ul

Misturar e incubar 1 hora a temperatura ambiente. Após esse tempo adicionar 2,0 ml do diluente Pharmacia. Essas amostras estarão diluídas 1/42 e são estáveis 7 dias em geladeira.

TÉCNICA:

	padrão	desconhecidos	controle	total
padrão	50 ul			
soro trat.		50 ul		
controle/trat			50 ul	
anti Apo(a) I ¹²⁵	50 ul	50 ul	50 ul	50ul
susp. de anticorpo	50 ul	50 ul	50 ul	

Agitar e incubar 1 hora a temperatura ambiente.

Solução de decantação	2 ml	2 ml	2 ml
-----------------------	------	------	------

Centrifugar 20 minutos a 1500 x g , decantar, colocar os tubos invertidos sobre papel absorvente e contar no contador gama por 1 minuto.

CÁLCULO DOS RESULTADOS: Dividir a contagem dos tubos padrão, desconhecidos e soros controles-pela contagem do tubo T e dividir por 100. Plotar as percentagens obtidas em papel lin-log para construir a curva de padrões. Ler as concentrações dos desconhecidos nesta curva e multiplicar os resultados por 42 (fator de diluição), para resultados em Unidades/litro. Dividir por 10 para obter resultados em Unidades/ dl de apo(a). Cada Unidade de apo(a) corresponde a 0,7 miligramas de Lipoproteína(a).

NORMAL: Até 20 mg/dl nível desejado
Acima de 20 mg/dl sinal de risco.