



Kit per la determinazione del colesterolo nel siero o plasma Metodo enzimatico colorimetrico Trinder CHOD-PAP

PRINCIPIO

La colesterolo esterasi (CHE) idrolizza gli esteri del colesterolo a colesterolo libero ed acidi grassi. La colesterolo ossidasi (CHOD) ossida il colesterolo libero totale a colest-4-en-3-one con formazione di perossido d'idrogeno che, in presenza di perossidasi (POD) reagisce con il 4-aminofenazone e fenolo producendo un composto colorato. L'intensità di quest'ultimo è direttamente proporzionale alla concentrazione di colesterolo totale presente nel campione esaminato.

REATTIVI - Concentrazione iniziale

R1 Tampone di Goods pH 6.8 > 75.0 mmol/l; acido colico > 0.4 mmol/l; fenolo > 8 mmol/l; colesterolo esterasi ≥ 500 U/l; colesterolo ossidasi ≥ 300 U/l; perossidasi ≥ 300 U/l; conservanti e stabilizzanti

R2 4-aminofenazone > 4 mmol/l

Standard colesterolo 200 mg/dl (5.17 mmol/l)

CAMPIONI

- Siero o plasma anticoagulato con eparina o EDTA.

Note

- Una volta raccolti, siero e plasma devono essere separati al più presto dai globuli rossi. Evitare anticoagulanti come fluoruro, citrato e ossalato.

- Il colesterolo è stabile nei campioni 7 giorni a 15-25°C, 28 giorni a 2-8°C.

VALORI DI RIFERIMENTO

Siero - plasma	Valori raccomandati:	< 200 mg/dl (5.17 mmol/l)
	Valori limite superiori:	200-239 mg/dl (5.17 - 6.18 mmol/l)
	Valori alti:	≥ 240 mg/dl (6.21 mmol/l)

I valori di riferimento sono da considerarsi indicativi in quanto ogni laboratorio dovrebbe ricercare quelli della popolazione su cui opera. I risultati dei test dovrebbero essere interpretati unitamente alle informazioni derivanti dalle valutazioni cliniche del paziente.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

- Conservare il kit a 2-8°C. Non congelare i reattivi.

- Dopo l'apertura, i reagenti **R1**, **R2** e lo **Standard** sono stabili fino alla data di scadenza indicata se richiudi immediatamente dopo il prelievo, protetti da contaminazione, evaporazione, luce diretta e conservati alla temperatura corretta.

- Stabilità della soluzione di lavoro (**R1 + R2**): 60 giorni a 2-8°C.

PREPARAZIONE DEI REATTIVI

I reattivi sono liquidi e pronti all'uso. Per l'utilizzo come monoreattivo (procedimento "campione starter") aggiungere ogni 4 ml del reattivo **R1**, 1 ml del reattivo **R2**. Togliere i reattivi dal frigo solo il tempo necessario per il loro utilizzo e richiuderli subito dopo.

NOTE

- Il kit con la presente metodica deve essere utilizzato in manuale. Per l'utilizzo in automatico consultare le applicazioni specifiche.

- Valutare attentamente i risultati se l'estinzione del reattivo di lavoro è > 0.300 a 510 nm.

- Evitare di esporre i reattivi alla luce diretta, contaminazione ed evaporazione.

- I volumi indicati nel procedimento possono essere variati proporzionalmente.

- In caso di reclamo o di richiesta del controllo di qualità del presente kit, indicare il numero di lotto riportato sulla confezione o, in alternativa, il numero di lotto dei singoli componenti.

- Una leggera colorazione rosa può rendersi evidente nel reattivo R1 e ciò non pregiudica assolutamente l'utilizzo del kit.

MATERIALI AUSILIARI

Materiali necessari non contenuti nel kit: soluzioni diluenti, vetreria e monouso, sistemi di dosaggio e misurazione, calibratori per la taratura degli strumenti.

CONTROLLO DI QUALITÀ

È necessario eseguire i controlli ad ogni utilizzo del kit e verificare che i valori ottenuti siano inclusi nell'intervallo di riferimento riportato nelle istruzioni d'uso.

Sieri consigliati:

REF 20350 Precise Norm

REF 20360 Precise Path

PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

Il prodotto non è classificato come sostanza pericolosa (DLg. N.285 art.28 Legge n.128 del 1998). La concentrazione totale dei componenti è inferiore ai limiti riportati dalle Direttive 67/548/CEE e 88/379/CEE e successive modifiche sulla classificazione, imballaggio ed etichettatura delle sostanze pericolose. È consigliabile tuttavia maneggiare il prodotto con cautela secondo le norme di buona pratica di laboratorio.

Attenzione: i reattivi contengono Sodio Azide (0.095%) come conservante. Evitare l'ingestione ed il contatto con pelle, occhi e mucose.

SMALTIMENTO RIFIUTI

Il prodotto deve essere smaltito secondo le locali normative in materia di gestione dei rifiuti.

PROCEDIMENTO

Lunghezza d'onda λ: 510 (500-546) nm
Temperatura di lavoro 37°C
Cammino ottico 1 cm
Tipo di reazione "end point" (in incremento)

Portare i reattivi a 15-25°C prima del loro utilizzo.

- PROCEDIMENTO MONOREATTIVO "campione starter"

	BIANCO	STD	CAMPIONE
REATTIVO DI LAVORO	1000 µl	1000 µl	1000 µl
ACQUA DISTILLATA	10 µl	--	--
CAMPIONE	--	--	10 µl
STANDARD	--	10 µl	--

Agitare poi incubare 5 min. a 37°C. Leggere l'estinzione del campione (EC) e dello standard (ESTD) contro il bianco reattivo. Il colore sviluppato è stabile per circa 60 min. a 15-25°C al riparo dalla luce diretta.

- PROCEDIMENTO BIREATTIVO "substrato starter"

	BIANCO	STD	CAMPIONE
REATTIVO R1	800 µl	800 µl	800 µl
ACQUA DISTILLATA	10 µl	--	--
CAMPIONE	--	--	10 µl
STANDARD	--	10 µl	--

Mescolare poi incubare a 37°C per circa 1', quindi aggiungere:

	BIANCO	STD	CAMPIONE
REATTIVO R2	200 µl	200 µl	200 µl

Agitare poi incubare 5 min. a 37°C. Leggere l'estinzione del campione (EC) e dello standard (ESTD) contro il bianco reattivo. Il colore sviluppato è stabile per circa 60 min. a 15-25°C al riparo dalla luce diretta.

CALCOLO

$$\text{Colesterolo [mg/dl] o [mmol/l]} = \text{EC/ESTD} \times \text{Conc. STD}$$

FATTORE DI CONVERSIONE

$$\text{Colesterolo [mg/dl]} \times 0.02586 = \text{Colesterolo [mmol/l]}$$

PRESTAZIONI DEL REATTIVO

Interferenze

La bilirubina non interferisce con il test sino alla concentrazione di 15 mg/dl.

I trigliceridi non interferiscono sino alla concentrazione di 1000 mg/dl.

L'emoglobina non interferisce sino alla concentrazione di 500 mg/dl.

Linearità

La reazione è lineare tra 2-800 mg/dl (0.052-20.69 mmol/l). Campioni superiori a 800 mg/dl devono essere diluiti con soluzione fisiologica. Moltiplicare il risultato per il fattore di diluizione.

Precisione "intra-Assay" (NELLA SERIE)

Determinata su 30 replicati per ciascun controllo (L-N-H) (Low-Normal-High).

Risultati ottenuti:

	(mg/dl)	L = 87.10	N = 182.80	H = 220.90
D.S.		1.81	3.50	3.46
C.V.%		2.08	1.92	1.57

Precisione "inter-Assay" (FRA LE SERIE)

Determinata su 15 replicati per ciascun controllo (L-N-H) per 3 giorni. Risultati ottenuti:

	(mg/dl)	L = 90.07	N = 178.53	H = 225.40
D.S.		2.08	2.67	3.66
C.V.%		2.31	1.49	1.62

Sensibilità analitica

Soglia di sensibilità espressa dal metodo: 2 mg/dl (0.052 mmol/l).

Correlazione

Un metodo equivalente preso a riferimento, correlato su 21 campioni con il reattivo in esame, ha dato un fattore di correlazione **r = 0.99**

BIBLIOGRAFIA

Trinder P: J. Clin. Path., 22, 158 (1969).

Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC: Clin. Chem., 20, 470 (1974).

Talke H, Schubert GE: Klin. Wchens., 43, 174 (1965).

Kaplan LA, Pesce AJ: "Clinical Chemistry", Mosby Ed. (1996).

SIMBOLOGIA



Consultare istruzioni per l'uso



Marchio CE (prodotto conforme ai requisiti della Dir. 98/79/CE)



Limiti temperatura di conservazione



Dispositivo medico-diagnostico in vitro



Fabbricante

Kit for measurement of cholesterol in serum or plasma

Colorimetric enzymatic Trinder method CHOD-PAP

PRINCIPLE

Free cholesterol and cholesterol released from its esters after enzymatic hydrolysis are oxidized enzymatically (CHE). The free cholesterol is oxidized by cholesterol oxidase (CHOD) to colest-4-en-3-one giving hydrogen peroxide. The indicator quinoneimine is formed from hydrogen peroxide that in presence of peroxidase (POD), reacts with 4-aminophenazone and phenol to form a coloured compound. The colour intensity is directly proportional to the cholesterol total concentration in the tested sample.

REAGENTS

R1 Goods buffer pH 6.8 > 75.0 mmol/l; cholic acid > 0.4 mmol/l; phenol > 8 mmol/l; cholesterol esterase ≥ 500 U/l; cholesterol oxidase ≥ 300 U/l; peroxidase ≥ 300 U/l; conservatives and preservatives

R2 4-aminophenazone > 4 mmol/l

STD cholesterol 200 mg/dl (5.17 mmol/l)

SAMPLE

- Serum-heparinized plasma or EDTA plasma.

Note

- After picked up, serum and plasma must be separated, as soon as possible, from red cells. Avoid anticoagulants as fluoride, citrate and oxalate.
- The cholesterol is stable in the samples for 7 days if stand at 15-25°C or 28 days at 2-8°C.

REFERENCE VALUES

Serum - plasma	Values recommended:	< 200 mg/dl (5.17 mmol/l)
	Values borderline higher:	200-239 mg/dl (5.17 - 6.18 mmol/l)
	Values high:	≥ 240 mg/dl (6.21 mmol/l)

References values are considered indicatives since each laboratory should establish references ranges for its own patient's population. The analytical results should be evaluated with other information coming from patient's clinical story.

STORAGE AND STABILITY

- Store the kit at 2-8°C. Do not freeze the reagents.
- After opening, the reagents **R1**, **R2** and the **standard (R3)** are stable up to the expiry date if recapped immediately and protected from contamination, evaporation, direct light, and stored at the correct temperature.
- Working solution stability (**R1**+ **R2**): 60 days at 2-8°C.

PREPARATION OF REAGENTS

Reagents are liquid and ready to use. About using as monoreagent ("sample-starter" procedure) add to every 4 ml of **R1** reagent, 1 ml of **R2** reagent. Keep out the reagents from refrigerator only for the use and recap them immediately.

NOTE

- The kit, according to this method, must be used in manual procedures. About automatic using follow specific applications.
- Evaluate carefully the results if working reagent absorbance is > 0.300 at 510 nm.
- Avoid direct light, contamination and evaporation.
- The volumes in the procedure can be changed proportionally.
- In case of complaint or quality control request, refer to the lot number on the package or the lot number on the singles vials.
- A light pink color may appear in R1 reagent without affecting the use of the kit.

AUXILIARY EQUIPMENT

Materials not included in the kit: diluent solutions, laboratory glassware, disposable tips, photometers and calibrators.

QUALITY CONTROLS

It's necessary, every time the kit is used, to make the quality controls and to check that values obtained are within the acceptance range provided in the insert.

Suggested serum:

REF 20350 Precise Norm **REF** 20360 Precise Path

PRECAUTION IN USE

The product is not classified as dangerous (DLg. N. 285 art. 28 l. n. 128/1998). The total concentration of components is lower than the limits reported by 67/548 and 88/379 CE Regulations (and following modifications) about classification, packaging and labelling of dangerous substances.
However the reagent should be handled with caution, according to good laboratory practice.

Caution: the reagents contain Sodium Azide (0.095%) as preservative. Avoid swallowing and contacting with skin, eyes and mucous membranes.

WASTE MANAGEMENT

Please refer to the local legal requirements.

PROCEDURE

Wavelength λ: 510 (500-546) nm
Working temperature 37°C
Optical path 1 cm
Reaction "end point" (increasing)

Bring the reagents at 15-25°C before using them.

- MONOREAGENT PROCEDURE "sample starter"

WORKING REAGENT	BLANK	STD	SAMPLE
DISTILLED WATER	1000 µl	1000 µl	1000 µl
SAMPLE	10 µl	--	--
STANDARD	--	--	10 µl
	--	10 µl	--

Mix, then incubate for 5' at 37°C. Measure the absorbance of sample (EC) and standard (ESTD) against the reagent blank. The colour obtained is stable for about 60' if stand at 15-25°C and protected from light.

- BIREAGENT PROCEDURE "substrate starter"

REAGENT R1	BLANK	STD	SAMPLE
DISTILLED WATER	800 µl	800 µl	800 µl
SAMPLE	10 µl	--	--
STANDARD	--	--	10 µl
	--	10 µl	--

Mix, incubate at 37°C for 1' and then add:

REAGENT R2	BLANK	STD	SAMPLE
	200 µl	200 µl	200 µl

Mix, then incubate for 5' at 37°C. Measure the absorbance of sample (EC) and standard (ESTD) against the reagent blank. The colour obtained is stable for about 60' if stand at 15-25°C and protected from light.

CALCULATION

$$\text{Cholesterol [mg/dl] o [mmol/l]} = \text{EC/ESTD} \times \text{Conc. STD}$$

CONVERSION FACTOR

$$\text{Cholesterol [mg/dl]} \times 0.02586 = \text{Cholesterol [mmol/l]}$$

ANALYTICAL PERFORMANCES

Interferences

Bilirubin does not interfere up to concentration of 15 mg/dl.
Triglycerides do not interfere up to concentration of 1000 mg/dl.
Hemoglobin does not interfere up to concentration of 500 mg/dl.

Linearity

Reaction is linear between 2-800 mg/dl (0.052-20.69 mmol/l). Samples with values exceeding 800 mg/dl must be diluted with saline solution. Multiply, then, the result for diluting factor.

"Intra-Assay" precision (within-Run)

Determined on 30 samples for each control (L-N-H) (Low-Normal-High).

Results:

MEAN	(mg/dl)	L = 87.10	N = 182.80	H = 220.90
S.D.		1.81	3.50	3.46
C.V.%		2.08	1.92	1.57

"Inter-Assay" precision (between-Run)

Determined on 15 samples for each control (L-N-H) for 3 days.

Results:

MEAN	(mg/dl)	L = 90.07	N = 178.53	H = 225.40
S.D.		2.08	2.67	3.66
C.V.%		2.31	1.49	1.62

Analytical sensitivity

The test sensitivity in terms of detection limit is 2 mg/dl (0.052 mmol/l).

Correlation

A study based comparing this method with a similar method on 21 samples has given a correlating factor **r = 0.99**

BIBLIOGRAPHY

Trinder P: J. Clin. Path., 22, 158 (1969).
Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC: Clin. Chem., 20, 470 (1974).
Talke H, Schubert GE: Klin. Wchens., 43, 174 (1965).
Kaplan LA, Pesce AJ: "Clinical Chemistry", Mosby Ed. (1996).

SYMBOLS



Read instruction for use



CE mark (requirement of 98/79 CE regulation)



Storing temperature limits



In vitro medical device



Producer