



Kit per la determinazione enzimatica diretta del colesterolo LDL nel siero - Metodo ad eliminazione

PRINCIPIO

Questo metodo consente una misura diretta del colesterolo LDL attraverso l'uso di particolari tensioattivi che permettono l'eliminazione del colesterolo contenuto nei chilomicroni, nelle frazioni VLDL e HDL in una reazione a due step. Nel primo step il colesterolo, contenuto nelle frazioni VLDL, HDL e chilomicroni, viene eliminato in particolari condizioni attraverso una specifica reazione di ossidazione (colesterolo esterasi, colesterolo ossidasi) e di degradazione (catalasi) della corrispondente acqua ossigenata formata. Nel secondo step il colesterolo LDL rimanente, in presenza di particolari tensioattivi, viene trasformato in un corrispondente derivato chinonico colorato (colesterolo esterasi, colesterolo ossidasi, perossidasi) la cui intensità di colore è proporzionale alla quantità di colesterolo LDL presente nel campione in esame.

REATTIVI - Concentrazione iniziale

R1 Tampone Mes (pH 6.3); colesterolo esterasi ≥ 1500 U/l; colesterolo ossidasi ≥ 1500 U/l; perossidasi ≥ 1300 ppg U/l; 4-aminoantipirine $\geq 0.1\%$; ascorbato ossidasi ≥ 3000 U/l; conservanti

R2 Tampone Mes (pH 6.3); N,N-bis(4-sulfobutyl)-toluidine ≥ 1.0 mM; conservanti

CAMPIONI

- Siero.

Note

- Il colesterolo LDL è stabile nei campioni fino a 3 giorni a 2-8°C.

VALORI DI RIFERIMENTO

	Livelli raccomandati	Rischio moderato	Rischio elevato
Colesterolo LDL:	< 130 mg/dl (< 3.37 mmol/l)	130 - 159 mg/dl (3.37 - 4.12 mmol/l)	≥ 160 mg/dl (≥ 4.14 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 flaconi **R1** e **R2** sono stabili fino alla data di scadenza indicata se richiusi immediatamente dopo il prelievo, protetti da contaminazione, evaporazione, luce diretta e conservati alla temperatura corretta.
- Stabilità della soluzione di lavoro (**R1+ R2**): 30 giorni a 2-8°C.

PREPARAZIONE DEI REATTIVI

I reattivi sono liquidi e pronti all'uso.

NOTE

- Il kit con la presente metodica deve essere utilizzato in manuale. Per l'utilizzo in automatico consultare le applicazioni specifiche.
- I reattivi devono essere limpidi e, in caso presentino torpidità, non devono essere utilizzati.
- Il reattivo R1 può assumere nel tempo una colorazione verde che non ha influenza sulle sue prestazioni.
- Non utilizzare materiali di controllo e di calibrazione contenenti sodio azide che inibisce l'enzima catalasi contenuto nel reattivo R1.
- 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.

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 20120 HDL/LDL calibrator HDL/LDL control lipidic

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 : 600 (570-600) nm
Temperatura di lavoro 37°C
Cammino ottico 1 cm
Tipo di reazione "end point" (in incremento)

Portare i reattivi a 37°C prima del loro utilizzo.

- PROCEDIMENTO BIREATTIVO "substrato starter"

	BIANCO	CAMPIONE	CALIBRATORE
ACQUA DISTILLATA	3 μ l	--	--
CAMPIONE	--	3 μ l	--
CALIBRATORE	--	--	3 μ l
REATTIVO R1	300 μ l	300 μ l	300 μ l
Mescolare, incubare a 37°C per 5' poi aggiungere:			
	BIANCO	CAMPIONE	CALIBRATORE
REATTIVO R2	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Mescolare ed incubare a 37°C per 5'. Effettuare la lettura di assorbanza del campione (AC) e del calibratore (Acal) contro il bianco reagente.			

CALCOLO

$$\text{Colesterolo LDL [mg/dl] o [mmol/l]} = \text{AC} / \text{Acal} \times \text{CAL}^*$$

*CAL = concentrazione di colesterolo LDL del calibratore

FATTORE DI CONVERSIONE

Colesterolo LDL [mg/dl] $\times 0.0259$ = Colesterolo LDL [mmol/l]

PRESTAZIONI DEL REATTIVO

Interferenze

- La bilirubina non interferisce con il test sino alla concentrazione di 20 mg/dl.
- I trigliceridi non interferiscono sino alla concentrazione di 1293 mg/dl.
- L'emoglobina non interferisce sino alla concentrazione di 500 mg/dl.
- L'acido ascorbico non interferisce sino alla concentrazione di 50 mg/dl.
- Le gamma-globuline non interferiscono sino alla concentrazione di 5000 mg/dl.

Linearità

La reazione è lineare sino alla concentrazione di 992 mg/dl con un intervallo di misura di 0.278-992 mg/dl. Campioni superiori a 992 mg/dl devono essere diluiti con soluzione fisiologica. Moltiplicare il risultato per il fattore di diluizione.

Precisione "intra-Assay" (NELLA SERIE)

Determinata su 20 replicati per ciascun controllo (L-N-H) (Low-Normal-High).

Risultati ottenuti:

MEDIA	[mg/dl]	L = 98.1	N = 146.5	H = 209.8
D.S.		0.72	0.96	1.31
C.V.%		0.73	0.66	0.62

Precisione "inter-Assay" (FRA LE SERIE)

Determinata su 40 replicati per ciascun controllo (L-N-H) per 10 giorni. Risultati ottenuti:

MEDIA	[mg/dl]	L = 98.1	N = 142.7	H = 207.3
D.S.		2.2	2.8	3.6
C.V.%		2.27	1.95	1.73

Sensibilità analitica

Soglia di sensibilità espressa dal metodo: 0.278 mg/dl.

Correlazione

Un metodo equivalente preso a riferimento, correlato su 92 campioni con il reattivo in esame, ha dato un fattore di correlazione $r = 0.97$

BIBLIOGRAFIA

- NCCLS Document: "Procedures for the Collection of Arterial Blood Specimens; Approved Standard - Third Edition (1999)".
- Kaplan, L.A., Pesce, A.J.: "Clinical Chemistry", Mosby Ed. (1996).
- EU-Dir 1999/11 Commission Directive of 8 March 1999 adapting to technical progress the principles of Good Laboratory Practice as specified in Council Directive 87/18/EEC.
- Jakobs, D.S., Kasten, Jr., B.L., Demmott, W.R., Wolfson, W.L.: "Laboratory Test Handbook", Lexi-Comp and Williams & Wilkins Ed. (2nd Edition - 1990).
- M. Okada et al.: Low-density lipoprotein cholesterol can be chemically measured: A new superior method, J. Lab. Clin. Med., in press.
- Bachorik, P.S., Ross, J.W., "national Cholesterol Education Program Recommendations for measurement of low-density lipoprotein cholesterol: executive summary". Clin. Chem. 41: 1414-1420 (1995).

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 direct enzymatic measurement of LDL cholesterol in serum Elimination method

PRINCIPLE

This assay can directly measure LDL cholesterol level in serum thanks to an elimination method that consists of two specific steps. In the first step, chylomicron, VLDL and HDL are eliminated under specific conditions so cholesterol is derived only from LDL. In fact these fractions are oxidized (cholesterol esterase, cholesterol oxidase) to cholestenone and H₂O₂, that is subsequently degraded by catalase. In the second step, after various enzymatic reactions and in the presence of specific surfactants, remaining LDL cholesterol can be measured specifically as a colour formation (quinone pigment), which intensity is proportional to the concentration of LDL cholesterol contained in the sample.

REAGENTS

- R1** Mes buffer (pH 6.3); cholesterol esterase ≥ 1500 U/l;
 colesterolo oxidase ≥ 1500 U/l; peroxidase ≥ 1300 ppg U/l;
 4-aminoantipyrine ≥ 0.1%; ascorbate oxidase ≥ 3000 U/l; preservatives
- R2** Mes buffer (pH 6.3); N,N-bis(4-sulfobutyl)-toluidine ≥ 1.0 mM; preservatives

SAMPLE

- Serum.

Note

- The LDL cholesterol is stable in the samples up to 3 days at 2-8°C.

REFERENCE VALUES

	Recommended levels	Moderate risk	High risk
LDL cholesterol:	< 130 mg/dl (< 3.37 mmol/l)	130 - 159 mg/dl (3.37 - 4.12 mmol/l)	≥ 160 mg/dl (≥ 4.14 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 vials **R1** and **R2** 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**): 30 days at 2-8°C.

PREPARATION OF REAGENTS

Reagents are liquid and ready to use.

NOTE

- The kit, according to this method, must be used in manual procedures. About automatic using follow specific applications.
- The reagents must be limpid; do not use if turbid.
- A possible green coloration of reagent R1 does not affect the reagent performances.
- Do not use calibration and control materials that contain sodium azide as it is an inhibitor for the catalase enzyme contained in reagent R1.
- 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.

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 20120 HDL/LDL calibrator HDL /LDL control lipidic

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: 600 (570-600) nm
Working temperature	37°C
Optical path	1 cm
Reaction	"end point" (increasing)

Bring the reagents at 37°C before using them.

- BIREAGENT PROCEDURE "substrate starter"

	BLANK	SAMPLE	CALIBRATOR
DISTILLED WATER	3 µl	--	--
SAMPLE	--	3 µl	--
CALIBRATOR	--	--	3 µl
REAGENT R1	300 µl	300 µl	300 µl
Mix, incubate at 37°C for 5' and then add:			
	BLANK	SAMPLE	CALIBRATOR
REAGENT R2	100 µl	100 µl	100 µl
Mix and incubate at 37°C for 5'. Read the absorbance of sample (AC) and calibrator (Acal) against the reagent blank.			

CALCULATION

$$\text{LDL cholesterol [mg/dl] o [mmol/l]} = \text{AC} / \text{Acal} \times \text{CAL}^*$$

*CAL = concentration of LDL cholesterol of the calibrator

CONVERSION FACTOR

LDL cholesterol [mg/dl] x 0.0259 = LDL cholesterol [mmol/l]

ANALYTICAL PERFORMANCES

Interferences

Bilirubin does not interfere up to concentration of 20 mg/dl.
 Triglycerides do not interfere up to concentration of 1293 mg/dl.
 Hemoglobin does not interfere up to concentration of 500 mg/dl.
 Ascorbate acid does not interfere up to concentration of 50 mg/dl.
 Gamma-globulins do not interfere up to concentration of 5000 mg/dl.

Linearity

Reaction is linear up to a concentration of 992 mg/dl with a range of 0.278-992 mg/dl. Samples with values exceeding 992 mg/dl must be diluted with saline solution. Multiply, then, the result for diluting factor.

"Intra-Assay" precision (within-Run)

Determined on 20 samples for each control (L-N-H) (Low-Normal-High).

Results:

MEAN	[mg/dl]	L = 98.1	N = 146.5	H = 209.8
S.D.		0.72	0.96	1.31
C.V.%		0.73	0.66	0.62

"Inter-Assay" precision (between-Run)

Determined on 40 samples for each control (L-N-H) for 10 days.

Results:

MEAN	[mg/dl]	L = 98.1	N = 142.7	H = 207.3
S.D.		2.2	2.8	3.6
C.V.%		2.27	1.95	1.73

Analytical sensitivity

The test sensitivity in terms of detection limit is 0.278 mg/dl.

Correlation

A study based comparing this method with a similar method on 92 samples has given a correlating factor **r = 0.97**


BIBLIOGRAFIA


NCCLS Document: "Procedures for the Collection of Arterial Blood Specimens; Approved Standard – Third Edition (1999)".
 Kaplan, L.A., Pesce, A.J.: "Clinical Chemistry", Mosby Ed. (1996).
 EU-Dir 1999/11 Commission Directive of 8 March 1999 adapting to technical progress the principles of Good Laboratory Practice as specified in Council Directive 87/18/EEC.
 Jakobs, D.S., Kasten, Jr., B.L., Demmott, W.R., Wolfons, W.L.: "Laboratory Test Handbook", Lexi-Comp and Williams & Wilkins Ed. (2nd Edition - 1990).
 M. Okada et al.: Low-density lipoprotein cholesterol can be chemically measured: A new superior method, J. Lab. Clin. Med., in press.
 Bachorik, P.S., Ross, J.W., "national Cholesterol Education Program Recommendations for measurement of low-density lipoprotein cholesterol: executive summary". Clin. Chem. 41: 1414-1420 (1995).

SYMBOLS

 Read instruction for use

 CE mark (requirement of 98/79 regulation)

 Storing temperature limits

 In vitro medical device

 Producer