

Kit per la determinazione enzimatica diretta del colesterolo HDL nel siero o plasma - Metodo ad eliminazione

PRINCIPIO

La determinazione del colesterolo HDL con metodo omogeneo si basa su un nuovo metodo per eliminazione che è più specifico rispetto ai metodi cosiddetti "per bloccaggio". Il metodo per eliminazione si basa su due step specifici. Nel primo step il colesterolo contenuto nelle frazioni VLDL, LDL e chilomicroni viene eliminato in particolari condizioni attraverso una specifica reazione di ossidazione a colestene e acqua ossigenata che viene successivamente degradata dalla catalasi endogena. Nel secondo step il colesterolo HDL rimanente, in presenza di particolari tensioattivi, viene trasformato in un derivato chinonico colorato (colesterolo esterasi, colesterolo ossidasi, perossidasi) la cui intensità di colore è proporzionale alla quantità di colesterolo HDL presente nel campione in esame.

REATTIVI - Concentrazione iniziale

- R1** Tampone di Goods; colesterolo ossidasi > 1000 U/l; perossidasi > 1300 U/l; N,N-bis(4-sulphobutyl)-m-toluidine-disodium (DSBmT) 1 mM/L; ascorbato ossidasi >3000 U/l; conservanti
- R2** Tampone di Goods; colesterolo esterasi > 1500 U/l; 4-aminoantipyrine (4-AAP) 1 mM/L; conservanti

CAMPIONI

- Siero o plasma (EDTA-Na₂, sodio citrato, sodio eparina)

Note

- Non utilizzare campioni emolizzati.
- Il colesterolo HDL è stabile nei campioni fino a 3 giorni a 2-8°C.

VALORI DI RIFERIMENTO

	Normale	Rischio moderato	Alto rischio
Uomini	> 55 mg/dl	35 - 55 mg/dl	< 35 mg/dl
Donne	> 65 mg/dl	45 - 65 mg/dl	< 45 mg/dl

I valori di riferimento sono da considerarsi indicativi in quanto ogni laboratorio dovrebbe ricercare quelli della popolazione su cui opera. I risultati del 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.
- 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

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 "fixed time" (in incremento)

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

- PROCEDIMENTO BIREATTIVO "substrato starter"

	BIANCO	CAMPIONE	CALIBRATORE
ACQUA DISTILLATA	3 µl	--	--
CAMPIONE	--	3 µl	--
CALIBRATORE	--	--	3 µl
REATTIVO R1	300 µl	300 µl	300 µl

Mescolare, incubare a 37°C per 5 min. poi aggiungere:

	BIANCO	CAMPIONE	CALIBRATORE
REATTIVO R2	100 µl	100 µl	100 µl

Mescolare e, dopo 30 sec. a 37°C, eseguire contro il bianco reagente la prima lettura di assorbanza del campione (A1C) e del calibratore (A1Cal). Dopo i successivi 3 min., eseguire la seconda lettura di assorbanza del campione (A2C) e del calibratore (A2Cal).

CALCOLO

$$\text{Colesterolo HDL [mg/dl]} \text{ o [mmol/l]} = (A2C - A1C)/(A2Cal - A1Cal) \times CAL^*$$

*CAL = concentrazione di colesterolo HDL del calibratore

FATTORE DI CONVERSIONE

Colesterolo HDL [mg/dl] x 0.0259 = Colesterolo HDL [mmol/l]

PRESTAZIONI DEL REATTIVO

Interferenze

La bilirubina non interferisce con il test sino alla concentrazione di 60 mg/dl.
 I trigliceridi non interferiscono sino alla concentrazione di 1800 mg/dl.
 L'emoglobina non interferisce sino alla concentrazione di 1000 mg/dl.
 L'acido ascorbico non interferisce sino alla concentrazione di 100 mg/dl.
 Le gamma-globuline non interferiscono sino alla concentrazione di 5000 mg/dl

Linearità

La reazione è lineare sino alla concentrazione di 200 mg/dl con un intervallo di misura di 2.5-200 mg/dl. Campioni superiori a 200 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 = 32.9	N = 50.6	H = 101.4
D.S.		0.3	0.2	0.7
C.V.%		0.8	0.5	0.7

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 = 32.8	N = 50.0	H = 100.1
D.S.		0.4	0.7	1.1
C.V.%		1.3	1.5	1.1

Sensibilità analitica

Soglia di sensibilità espressa dal metodo: 2.5 mg/dl.

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

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.
 Sachiko Izawa et al.: A new direct method for measuring HDL-cholesterol which does not produce any biased values. J. Med. and Pharm. Sci., 1385-1388, 37 (1997).
 Warnick, G.R., Wood, P.D., "National Cholesterol Education Program Recommendations for measurement of high-density lipoprotein cholesterol: executive summary". Clin. Chem. 41: 1427-1433 (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

Licensed under PCT/JP97/0442, PCT/JP00/03860

Kit for direct enzymatic measurement of HDL cholesterol in serum or plasma - Elimination method

PRINCIPLE

The determination of HDL cholesterol with homogeneous procedure is based on a novel methodology - the elimination method - which is more specific than the so called "blockage method". The elimination method consists of two specific steps. In the first step, chylomicron, VLDL and LDL fractions are eliminated under specific conditions so cholesterol is derived only from HDL. Infact these fractions are oxidized to cholestenone and hydrogen peroxide, that is subsequently degraded by catalase. In the second step, after various enzymatic reactions and in the presence of specific surfactants, remaining HDL cholesterol can be measured specifically as a colour formation (quinone pigment), which intensity is proportional to the concentration of HDL cholesterol contained in the sample.

REAGENTS

- R1** Good's buffer; cholesterol oxidase < 1000 U/l;
peroxidase > 1300 ppg U/l; N,N-bis(4-sulphobutyl)-m-toluidine-disodium (DSBmT) < 1 mM; ascorbate oxidase < 3000 U/l; preservatives
- R2** Good's buffer; cholesterol esterase < 1500 U/l;
4-aminoantipyrine (4-AAP) < 1 mM; preservatives

SAMPLE

- Serum or plasma (EDTA-Na₂, sodium citrate, sodium heparin)

Note

- Do not use samples with haemolysis.
- The HDL cholesterol is stable in the samples up to 3 days at 2-8°C.

REFERENCE VALUES

	Normal	Moderate risk	High risk
Men	> 55 mg/dl	35 - 55 mg/dl	< 35 mg/dl
Women	> 65 mg/dl	45 - 65 mg/dl	< 45 mg/dl

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.
- 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

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 "fixed time" (increasing)

Bring the reagents at 37°C before using them.

- BIREAGENT PROCEDURE "substrate starter"

	BLANK	SAMPLE	CALIBRATOR
DISTILLED WATER	3 μ l	--	--
SAMPLE	--	3 μ l	--
CALIBRATOR	--	--	3 μ l
REAGENT R1	300 μ l	300 μ l	300 μ l

Mix, incubate at 37°C for 5' and then add:

	BLANK	SAMPLE	CALIBRATOR
REAGENT R2	100 μ l	100 μ l	100 μ l

Mix and, after 30" at 37°C, read the first absorbance of sample (A1C) and calibrator (A1Cal) against the reagent blank. After 3', read the second absorbance of sample (A2C) and calibrator (A2Cal).

CALCULATION

$$\text{HDL cholesterol [mg/dl] o [mmol/l]} = (\text{A2C} - \text{A1C}) / (\text{A2Cal} - \text{A1Cal}) \times \text{CAL}^*$$

*CAL = concentration of HDL cholesterol of calibrator

CONVERSION FACTOR

$$\text{HDL cholesterol [mg/dl]} \times 0.0259 = \text{HDL cholesterol [mmol/l]}$$

ANALYTICAL PERFORMANCES

Interferences

Bilirubin does not interfere up to concentration of 60 mg/dl.
Triglycerides do not interfere up to concentration of 1800 mg/dl.
Hemoglobin does not interfere up to concentration of 1000 mg/dl.
Ascorbate acid does not interfere up to concentration of 100 mg/dl.
Gamma-globulins do not interfere up to concentration of 5000 mg/dl

Linearity

Reaction is linear up to a concentration of 200 mg/dl with a range of 2.5-200 mg/dl. Samples with values exceeding 200 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 = 32.9	N = 50.6	H = 101.4
S.D.		0.3	0.2	0.7
C.V.%		0.8	0.5	0.7

"Inter-Assay" precision (between-Run)

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

Results:

MEAN	[mg/dl]	L = 32.8	N = 50.0	H = 100.1
S.D.		0.4	0.7	1.1
C.V.%		1.3	1.5	1.1

Analytical sensitivity

The test sensitivity in terms of detection limit is 2.5 mg/dl.

Correlation

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

BIBLIOGRAPHY

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.
Sachiko Izawa et al.: A new direct method for measuring HDL-cholesterol which does not produce any biased values. J. Med. and Pharm. Sci., 1385-1388, 37 (1997).
Warnick, G.R., Wood, P.D., "National Cholesterol Education Program Recommendations for measurement of high-density lipoprotein cholesterol: executive summary". Clin. Chem. 41: 1427-1433 (1995).

SYMBOLS



Read instruction for use



CE mark (requirement of 98/79 regulation)



Storing temperature limits



In vitro medical device



Producer

Licensed under PCT/JP97/0442, PCT/JP00/03860