

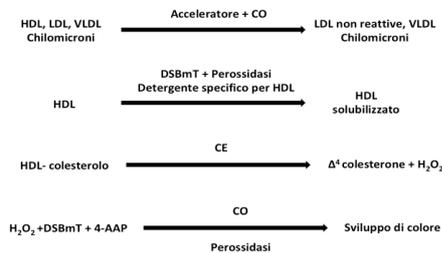
USO

Dispositivo medico-diagnostico in vitro, spettrofotometrico, per la determinazione della concentrazione del colesterolo HDL (HDL-c, *high density lipoprotein-cholesterol*) nel siero o plasma umano.

PRINCIPIO del METODO

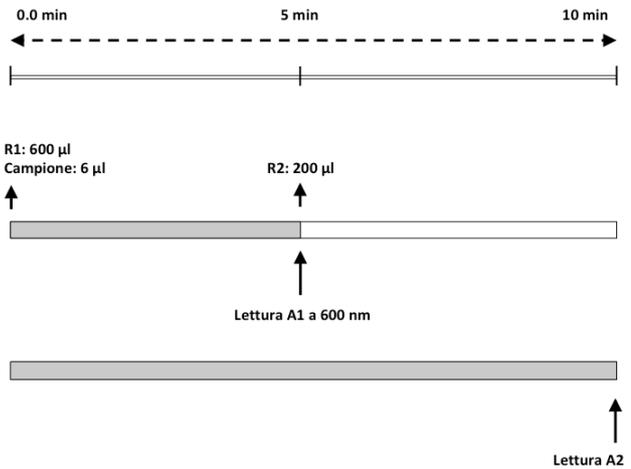
Il presente test diagnostico si basa sul metodo omogeneo per la determinazione diretta della concentrazione delle lipoproteine HDL-colesterolo in campioni di siero o plasma umani senza alcun pretrattamento o centrifugazione del campione stesso.

Si tratta di una formulazione del kit diagnostico in 2 reagenti che utilizza le proprietà di un unico detergente, come sotto illustrato. Il metodo si basa sull'accelerazione della reazione del colesterolo ossidasi (CO) con un colesterolo non esterificato non-HDL ed il successivo rilascio selettivo delle HDL-c mediante l'impiego di uno specifico detergente. Il primo reagente effettua una reazione enzimatica sul colesterolo non esterificato non-HDL, in modo che il perossido prodotto venga consumato attraverso una reazione mediata da enzima con attività perossidasi impiegante DSBmT con produzione di un composto incolore. Il secondo reagente contiene un detergente in grado di solubilizzare selettivamente le HDL, l'enzima colesterolo esterasi (CE) ed un cromogeno, in modo tale da sviluppare una colorazione necessaria per la determinazione quantitativa delle HDL-c. Questo tipo di analisi quantitativa può essere definita come *metodo selettivo con detergente-acceleratore*.



PROCEDURA ANALITICA (metodica manuale)

1. Portare i reagenti, i campioni, i calibratori ed i controlli di qualità a T.A.
2. Seguire lo schema sottoindicato termostatando la cuvetta a 37°C



CALCOLO DEI RISULTATI

$$\Delta A = A_2 - A_1$$

$$\text{HDL-Colesterolo (mg/dl)} = \frac{\Delta A \text{ campione}}{\Delta A \text{ calibratore}} \times \text{conc. calibratore (mg/dl)}$$

FATTORE di CONVERSIONE

$$\text{mg/dl} \times 0,0259 = \text{mmol/l (unità S.I.)}$$

Campioni a concentrazione > 200 mg/dl di HDL-c devono essere diluiti ed il risultato moltiplicato per il fattore di diluizione impiegato

VALORI di RIFERIMENTO

Concentrazioni di colesterolo-HDL utilizzate per classificare i gruppi di rischio

Colesterolo HDL		RISCHIO
Maschi	> 55 mg/dL (> 1.42 mmol/L)	Basso
	40 - 55 mg/dL (0.90 - 1.42 mmol/L)	Moderato
	< 40 mg/dL (< 1.04 mmol/L)	Alto
Femmine	> 65 mg/dL (> 1.68 mmol/L)	Basso
	45 - 65 mg/dL (1.16 - 1.68 mmol/L)	Moderato
	< 45 mg/dL (< 1.16 mmol/L)	Alto

CONTROLLO di QUALITÀ

Si raccomanda l'utilizzo materiale di controllo certificato, per verificare la qualità della procedura analitica. Ciascun Laboratorio deve stabilire la propria procedura interna di Controllo di Qualità.

CONSIDERAZIONI CLINICHE

Basse concentrazioni di colesterolo-HDL sono fortemente predittive di possibili patologie cardiache (CHD). Nello schema ATP III, una bassa concentrazione di colesterolo-HDL viene definita come un livello < 40 mg/dl (1.04 mmol/l), rispetto a quanto stabilito in ATP II dove il livello era previsto < 35 mg/dl (1993). Valori bassi di colesterolo-HDL vengono utilizzati come fattori di rischio per la stima di CHD a 10 anni, in correlazione con altre cause: trigliceridemia elevata, sovrappeso e obesità, scarso esercizio fisico e diabete di tipo 2. Altre cause da considerarsi sono: fumo di sigaretta, assunzione eccessiva di carboidrati (> del 60% del normale fabbisogno calorico), taluni farmaci, steroidi anabolizzanti ed estrogeni.

PRESTAZIONI DEL METODO

- Limite di rilevanza analitica: 2.5 mg/dl
- Linearità: fino a 200 mg/dl
- Precisione:

mg/dL	Intrasaggio			Intersaggio		
Media	32.9	50.6	101.4	32.8	50.0	100.1
SD	0.3	0.2	0.7	0.4	0.7	1.1
CV%	0.8	0.5	0.7	1.3	1.5	1.1
N	20	20	20	40	40	40

Errore totale

Si tratta di una misura delle caratteristiche analitiche complessive e comprende sia l'accuratezza che la precisione. L'Errore Totale corrisponde alla % di Bias + 1.96 x C.V. totale (CV_T).¹⁹ Il Bias % viene calcolato utilizzando l'algoritmo della regressione lineare, derivato dalla comparazione dell'HDL DIRETTO con il "Designated Comparison Method" mostrato sotto.^{17,18} Il CV (coefficiente di variazione) viene calcolato come CV_T = (CV_B² + CV_w²)^{1/2}.¹⁹ Viene sotto riportato il risultato su Hitachi 911 utilizzando campioni a concentrazione di trigliceridi <400 mg/dL.

CONTENUTO DEL KIT

Codice	Confezione	COMPOSIZIONE
DA3570H-80	HDL DIRETTO 80 mL	R1 2x30 ml + R2 1x20

COMPOSIZIONE DEI REAGENTI

Reagente 1. Tampone (pH 6), Colesterolo ossidasi <1000 U/L (da: E. Coli), Perossidasi (da: rafano) <1300 ppg U/L, N,N-bis(4-solfobutil)-m-toluidina-disodio (DSBmT) <1 mM, Acceleratore <1 mM, Conservante <1 mM, Ascorbico ossidasi (da: Curcubita sp.) <3000 U/L
Reagente 2. Tampone (pH 6±0.1), Colesterolo esterasi (da: Pseudomonas sp.), 4-Aminoantipirina (4-AAP), Detergente, Conservante

CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI.

I reagenti liquidi R.1 e R.2 sono pronti all'uso e risultano stabili fino alla data di scadenza, indicata sulle relative etichette, se conservati a 2-8°C ben chiusi, lontano da fonti di luce, evitando accuratamente la contaminazione durante l'uso. Non congelare. La stabilità "on board" (su autoanalizzatore) è di 60 giorni. Per l'utilizzo del calibratore far riferimento al manuale d'istruzione dello stesso.

DETERIORAMENTO DEI REAGENTI

I reagenti devono risultare sempre limpidi: qualora risultino torbidi dovranno essere eliminati. Verificare sempre la stabilità dei reagenti attraverso il controllo di qualità.

RACCOLTA E STABILITÀ DEI CAMPIONI

Il siero deve essere ottenuto per centrifugazione (entro 3 ore dal prelievo): è possibile utilizzare campioni di plasma (EDTA, eparina). I campioni di siero o plasma (da pazienti a digiuno da 12 ore) sono stabili per 2 settimane a 2-8°C o 3 mesi a -20°C. Eliminare i campioni contaminati. Non utilizzare plasma con citrato quale anticoagulante.

SOSTANZE INTERFERENTI

- Lipemia (< 18 g/L) non interferisce.
- Bilirubina (< 60 mg/dL) non interferisce.
- Emoglobina (< 1000 mg/dL) non interferisce.
- Ascorbato (< 100 mg/dL) non interferisce.
- Gamma-globulina a 5000 mg/dL non interferisce.
- Campioni contenenti N-acetilcisteina (NAC) non devono essere utilizzati
- Livelli di trigliceridi endogeni producono risultati accettabili di colesterolo-HDL fino a concentrazioni di 2000 mg/dL. Campioni a concentrazione di trigliceridi >2000 mg/dL devono essere diluiti e ritestati.
- Campioni provenienti da pazienti con cirrosi epatica risultano (in letteratura) mostrare concentrazioni di HDL più basse di quelle di riferimento.¹⁵
- Far riferimento alla presente voce bibliografica per ulteriori composti potenzialmente interferenti.¹⁴

MATERIALE NECESSARIO (non a corredo)

Procedura manuale

- Fotometro o spettrofotometro a cella termostata a 37°C programmabile a lunghezza d'onda di 600±5 nm
- Cronometro
- Cuvette da 1 cm. di cammino ottico
- Micropipette
- Calibratore: si consiglia la calibrazione con calibratore a base sierica, poiché l'eventuale utilizzo di soluzioni standard a base acquosa (standard chimico) può provocare sovra o sottostime.
- Sieri certificati per controllo di qualità

Procedura automatica

- Autoanalizzatore
- Calibratore: si consiglia la calibrazione con calibratore a base sierica, poiché l'eventuale utilizzo di soluzioni standard a base acquosa (standard chimico) può provocare sovra o sottostime.
- Sieri certificati per controllo di qualità

Concentrazione di Colesterolo-HDL	% Bias	CV Totale	Errore Totale
30 mg/dL	8.05%	1.53%	11.05%
50 mg/dL	4.31%	1.58%	7.40%
80 mg/dL	2.21%	1.29%	4.73%

- **Correlazione:** HDL DIRETTO (y) è stato confrontato con un metodo similare in (x). Sono stati ottenuti i seguenti risultati:

Metodo	HDL DIRETTO	Metodo di confronto (DCM)
n	52	52
Media (mg/dL)	58.3	56.3
Intervallo (mg/dL)	33.6-133.0	32.0-133.0
Analisi di regressione	Ultra = 0.99(DCM) + 2.81 mg/dL	

r = 0.996

Le caratteristiche analitiche sono state definite utilizzando strumentazione automatica (autoanalizzatore). I risultati possono variare in base alle apparecchiature impiegate.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI PER L'USO

1. Reagenti per uso esclusivo *in vitro*. NON INGERIRE
2. Tutti gli emoderivati ed i campioni biologici impiegati devono essere considerati POTENZIALMENTE INFETTI e, come tali, manipolati secondo la B.P.L.
3. Non ingerire ed evitare il contatto con la cute e/o le mucose
4. Tutti i reagenti ed i campioni devono essere trattati secondo la Normativa Vigente.
5. Non utilizzare oltre la data di scadenza.

NOTE

1. HDL DIRETTO può essere implementato su diversi autoanalizzatori. Ciascuna applicazione deve essere validata per dimostrare che i risultati siano in accordo con le prestazioni analitiche del presente metodo
2. Una corretta diagnosi clinica non può essere fatta tenendo conto del risultato di un unico esame, ma deve integrare i dati clinici e di laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

1. Gotto, AM, Lipoprotein metabolism and the etiology of hyperlipidemia, Hospital Practice, 23; Suppl. 1, 4 (1988).
2. Crouse, JR et al., Studies of low density lipoprotein molecular weight in human with coronary artery disease, J. Lipid Res., 26:566 (1985).
3. Badimon, JJ, Badimon, L., Fuster V., Regression of Atherosclerotic Lesions by HDL. Plasma Fraction in the Cholesterol-Fed Rabbit, Journal of Clinical Investigation, 1990; 85:1234-41.
4. Castelli, WP et al., HDL Cholesterol and other lipids in coronary heart disease, Circulation, 55:767 (1977).
5. Barr, DP, Russ EM, Eder, HA, Protein-lipid relationships in human plasma, Am. J. Med., 11; 480 (1951).
6. Gordon, T. et al., High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease, Am. J. Med., 62:707 (1977).
7. Williams, P., et al, HDL and coronary risk factor, Lancet, 1; 72, (1979).
8. Kannel, WB, Castelli, WP, Gordon, T., Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease.; Ann. Intern. Med., 90:85, (1979).
9. National Institutes of Health publication No. 93-3095, Sept. (1993).
10. Special Communication, Executive Summary of 3rd Report of the NCEP. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol (Adult Treatment Panel III), JAMA, Vol. 285, No. 19, May 16, 2001, pages 2486 - 2497.
11. Warnick, GR, Wood, PD, National Cholesterol Education Program Recommendations for Measurement of High-Density Lipoprotein Cholesterol: Executive Summary, Clinical Chemistry, Vol. 41, No. 10, 1427-1433 (1995).
12. Kimberly MM, et al. Selection, validation, standardization, and performance of a designated comparison method for HDL-cholesterol for use in the cholesterol reference method laboratory network. Clin Chem 1999; 45:1803-12.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards, National Evaluation Protocols for Interference Testing, Evaluation Protocol Number 7, Vol. 6, No. 13, August (1986).
14. Young, DS, Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, 3rd ed., AACC Press, Washington, DC, 1990, 3-104 thru 3-106.
15. Camps, J, Altered Composition of Lipoproteins in Liver Cirrhosis Compromises Three Homogeneous Methods for HDL-Cholesterol, Clinical Chemistry, 1999; 45:685-688.
16. Tietz, NW, Clinical Guide to Laboratory Tests, WB Saunders Co., 1986, p. 256.
17. Carey RN, Garber CC. Evaluation of methods. In: Kaplan LA, Pesce AJ, eds. Clinical Chemistry: theory, analysis and correlation. Third Edition. St. Louis: The CV Mosby Company, St. Louis, MO., 1996: 402-423.
18. Westgard JO, Carey RN, Wold S. Criteria for judging precision and accuracy in method development and evaluation. Clinical Chemistry 1974; 20:825-833.
19. Bachorik PS, Ross JW, for the National Cholesterol Education Program Working Group on Lipoprotein Measurements. National Cholesterol Education Program recommendations for measurement of low-density lipoprotein cholesterol: executive summary, Clin Chem 1995; 41:1414-1433.
20. National Reference system for Cholesterol, CRMLN HDL Cholesterol Protocol, November 2002.
21. Kimberly MM, et al., Selection, validation, standardization, and performance of a designated comparison method for HDL-cholesterol for use in the Cholesterol Reference Method Laboratory Network. Clinical Chemistry 1999; 45:1803-12.

Indice dei simboli

	Consultare le istruzioni per l'uso		Test per kit		Rappresentante autorizzato
	Esclusivamente per uso diagnostico <i>in vitro</i>		Data di scadenza		Monouso
	Conservare a 2-8 °C		Numero lotto		N. catalogo

Codici di Riordino:
DA3570H-80

HDL DIRETTO

80 mL



Bio Plastic Sas - 00100 Roma