Cholesterin

Reagenz zur quantitativen In-vitro-Bestimmung von Cholesterin im Blut und Serum / Plasma

CHO 142

Best. Nr. **CHO 142**
Inhalt: 40 Tests

Methode
Enzymatischer Farbtest, CHOD-PAP-Methode[1)]
Die Bestimmung kann sowohl mit Blut als auch mit Serum/Plasma durchgeführt werden. Blut wird durch das Reagenz sofort und vollständig hämolysiert. Der aus Blut bestimmte Wert wird auf Plasma bezogen.

Probenmaterial
Kapillarblut oder EDTA-Venenblut
Serum, Heparin- oder EDTA-Plasma
Kapillarblut sofort in die Einzeltestküvette pipettieren.
Haltbarkeit der hämolysierten Probe in der Pufferlösung:
bei +2 bis +8°C: 8 Stunden
bei +15 bis +30°C: 4 Stunden

Reagenz
Inhalt / Konzentrationen:
1. Startreagenz (Kappen in PE-Flasche)
   Cholesterinoxidase (CHOD) aus Brevibacterium >350 U/L, Peroxidase (POD) >4 kU/L, 4-Aminophenazon 0,20 mmol/L
2. Pufferlösung (vorportioniert in Rundküvetten)
   Lipoproteinlipase/Cholesterinesterase aus Mikroorg. >800 U/L, 4-Chlorphenol 9 mmol/L, Natriumazid <0,1 %, Triton X-100 < 1%, PIPES-Puffer 75 mmol/L, pH 7,6

Sicherheitshinweis
Die Pufferlösung (Rundküvette) enthält Natriumazid (< 0,1 %) und Triton X-100 (< 1%). Verschlucken, Berührung mit der Haut und Schleimhäuten vermeiden. Ein Sicherheitsdatenblatt wird auf Anforderung zur Verfügung gestellt.[2)]

Lagerung und Haltbarkeit
Die Reagenzien sind bei +2°C bis +8°C bis zu dem auf der Packung angegebenen Verfalldatum haltbar.
Schraubkappen erst unmittelbar vor der Messung aus dem Behälter entnehmen.

Messbedingungen
Messgeräte: Diaglobal Photometer

Messwellenlänge: 520nm

Temperatur: Raumtemperatur

Messbereich
20 - 1000 mg/dL (0,52 - 25,9 mmol/L)

Arbeitsanleitung
Die Bestimmung kann als Einzelmessung oder in Serie [mit Saldierung der E(0)-Werte] durchgeführt werden.

A. Einzelmessung

In Rundküvette pipettieren:	
	Analyse
Probe	10 µL
Gut mischen.	

- Test <**CHO**> anwählen
- Küvette mit Probe in das Photometer einsetzen (Nullpunkteinstellung)
- Kappe aus der PE-Flasche auf die Küvette aufschrauben und Startreagenz durch mehrmaliges Kippen lösen
- Taste [ON/ENTER] drücken
- Küvette wieder in das Photometer einsetzen
- Nach Ablauf der Reaktionszeit Ergebnis ablesen

B. Serienmessung (bis zu 20 Proben)

In Rundküvetten pipettieren:	
	Analyse
Probe	10 µL
Gut mischen.	

- Test <**CHO**> anwählen
- Küvetten mit Probe nacheinander in das Photometer (Nullpunkteinstellungen)
- Kappen aus der PE-Flasche auf die Küvetten aufschrauben und Startreagenz durch mehrmaliges Kippen lösen
- Taste [ON/ENTER] drücken
- Die erste Küvette **sofort** wieder in das Photometer einsetzen
- Nach Ablauf der Reaktionszeit Ergebnis ablesen
- Die übrigen Küvetten in der Reihenfolge der Nullpunkteinstellungen in das Photometer einsetzen
- Ergebnisse der jeweiligen Proben werden sofort angezeigt

Qualitätssicherung
Für die Qualitätssicherung empfehlen wir die Universal Kontrollseren der Firma Roche, www.roche.de:
PreciControl ClinChem Multi 1 / Multi 2 (4 x 5 mL)
Order-No.: 05 947 626 190 / 05 947 774 190
Ref.: Roche / Hitachi analyzers,
Method: CHOD-PAP stand. ID/MS

Klinische Interpretation
Zur Beurteilung des Risikofaktors Cholesterinämie werden folgende Referenzintervalle empfohlen:[3)]

	mg/dL	mmol/L
Geringes Risiko	> 200	> 5,2
Hohes Risiko	> 260	> 6,7

Zusammenfassung
Cholesterin gehört zu den essentiellen Bestandteilen von Zellmembranen und ist Ausgangssubstanz für die Synthese der Steroidhormone und Gallensäuren. Ca. 25 % stammen aus der Nahrung. Der Rest wird im Organismus synthetisiert. Aufgrund seiner Wasserunlöslichkeit wird Cholesterin im Plasma als Lipoprotein-Komplex transportiert.

Indikationen / Diagnostische Bedeutung:[1)]
- Früherkennung eines Arteriosklerose-Risikos
- Kontrolle lipidsenkender Therapien

Die Bestimmung des Gesamt-Cholesterins gehört zum Basisprogramm kardiovaskulärer Vorsorgeuntersuchungen. Entsprechend den Empfehlungen der European Atherosclerosis Society gilt heute ein Gesamt-Cholesterinwert von 200 mg/dL als Schwellenwert, dessen Überschreitung ein zunächst mäßig, dann stark ansteigendes Arteriosklerose-Risiko bedeutet.[3)] Dieses Risiko wird durch Faktoren wie Rauchen und Hypertonie potenziert. Eine weitergehende Risikobeurteilung ist durch Ermittlung der den Lipoproteinfraktionen HDL und LDL zuzuordnenden Cholesterinanteile möglich.

Zur Bestimmung des Gesamt-Cholesterins wird heute ausnahmslos die CHOD-PAP-Methode eingesetzt, die auch dem Diaglobal-Test zugrunde liegt, während die nichtenzymatische Liebermann-Burchard-Reaktion keine Bedeutung mehr für die Routinediagnostik besitzt.

Messprinzip
Die Cholesterinester werden enzymatisch gespalten, danach wird das freie Cholesterin mittels Cholesterinoxidase (CHOD) oxidiert und das hierbei gebildete H_2O_2 in einer PAP-Reaktion zu einem Farbstoff umgesetzt.[4)]

$$\text{Cholesterinester} + H_2O \xrightleftharpoons{\text{Cholesterinesterase}} \text{Cholesterin} + \text{Fettsäure}$$

$$\text{Cholesterin} + O_2 \xrightarrow{\text{Cholesterinoxidase}} \text{Cholestenon} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{4-Chlorphenol} + \text{4-Aminophenazon} \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \text{Chinoniminfarbstoff}$$

Die Konzentration des Chinoniminfarstoffes ist ein Maß für die Cholesterin-Konzentration in der Probe und wird photometrisch gemessen. Der Endpunkt der Reaktion wird vom Gerät selbsttätig erkannt.

Leistungsmerkmale
Spezifität / Interferenzen[5)]
Erhöhte Werte durch Hämoglobin (> 2,0 g/L), keine Störung durch Lipämie, Ascorbinsäure in physiologischen Konzentrationen (< 50 mg/dL) und Bilirubin (< 15 mg/dL). Arzneimittelinterferenzen: Erniedrigte Werte durch Methyldopa (> 50 mg/L) und Novaminsulfon (>150 mg/L) in Konzentrationen oberhalb des therapeutischen Bereichs.

Unpräzision
Die Reproduzierbarkeit wurde mit Human- und Kontrollproben überprüft.

In der Serie [n = 20]	Mittelwert [mg/dL]	Standard-Abweichung [mg/dL]	VK [%]
EDTA-Blut	188	5	2,5
Serum 1	201	3	1,5
Serum 2	402	5	1,3
Von Tag zu Tag [n = 20]	**Mittelwert [mg/dL]**	**Standard-Abweichung [mg/dL]**	**VK [%]**
Serum 1	199	3	1,6
Serum 2	398	6	1,5

Analytische Sensitivität
Untere Nachweisgrenze: 20 mg/dL (0,52 mmol/L)

Methodenvergleich
Ein Vergleich des Diaglobal-Tests CHO 142 (y), mit einem anderen, auf der CHOD-PAP-Methode basierenden, kommerziell erhältlichen Test (x), sowie ein Vergleich zwischen Werten, die mit Blut (y) und Plasma (x) des jeweils gleichen Probanden bestimmt wurden, lieferte nach dem Verfahren von Passing/Bablok[6)] folgende Korrelationsdaten:

a) Plasma
y = 0,990x + 3,5
r = 0,997
n = 60

b) EDTA-Blut / Plasma
y = 1,000x + 1,0
r = 0,988
n = 85

Konzentrationsbereich: 94 - 501 mg/dL

Hinweise zur Entsorgung
Abfallschlüsselnummer 180106:
Der Inhalt der Testpackung gilt als Sonderabfall. Reagenz nicht in Oberflächenwasser oder die Kanalisation gelangen lassen.
Entsorgung gemäß den behördlichen Vorschriften.
Nichtkontaminierte und restentleerte Verpackungen können einer Wiederverwertung zugeführt werden.

Literatur

1. Thomas L. Labor und Diagnose. 4.Aufl. Marburg: Die Medizinische Verlagsgesellschaft 1995: 200
2. http://www.diaglobal.de/de/service/downloads/index.html
3. Study Group, European Atherosclerosis Society. Eur Heart J. 1988; The recognisation and management of hyperlipidemia in adults.
4. Allain CC. Clin Chem 1974; 20:470
5. Sonntag O. Arzneimittelinterferenzen. Stuttgart, New York: Thieme Verlag, 1985:24
6. Passing H, Bablok W. A new biometric procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. J Clin Chem Clin Biochem. 1983; 21:709-720

Cholesterol

Reagent for quantitative In-vitro-determination of cholesterol in blood / serum / plasma

CHO 142

Order No. **CHO 142**
Content: 40 tests

Method
Enzymatic colorimetric test, CHOD-PAP method[1)]
The determination can directly employ both whole blood and serum/plasma. The blood is immediately and completely hemolysed by the reagent. The result obtained from blood samples refers to the plasma concentrations.

Sample material
Capillary blood or EDTA venous blood
Serum, heparinized or EDTA plasma
Pipette capillary blood immediately in single test cuvettes.
Stability of the haemolyzed sample in the buffer solution:
at +2 to +8°C: 8 hours
at +15 to +30°C: 4 hours

Reagent
Contents / concentrations:
1. Starter reagent (caps in PE-bottle)
   Cholesteroloxidase (CHOD) from Brevi bacterium >350 U/L, Peroxidase (POD) >4 kU/L, 4-Aminophenazone 0.20 mmol/L
2. Buffer solution (pre-portioned in round cuvettes)
   Lipoprotein lipase / Cholesterolesterase from microorg. >800 U/L, 4-Chlorophenol 9 mmol/L, Sodium azide <0.1 %, Triton X-100 < 1%, PIPES buffer 75 mmol/L, pH 7.6

Safety information
The buffer solution (round cuvette) contains Sodium azide (<0.1 %) and Triton X-100 . Do not swallow and avoid contact with skin and mucous membranes. If desired a safety data sheet will be provided.[2)]

Storage and shelf life
Reagents can be kept at a temperature between +2°C and +8°C until the expiry date indicated on the packaging.
Please take the screw caps out of the container just before the analysis and close the container immediately.

Measurement conditions
Measurement devices: Diaglobal Photometer

Meas. wavelength: 520nm
Temperature: Room temperature

Measurement range
20 - 1000 mg/dL (0.52 - 25.9 mmol/L)

Working instructions
The measurement can be performed as a single or serial measurement [with a balancing of the A(0) counts].

A. Single measurement

Pipette in round cuvette:	
	Analysis
Sample	10 µL
Mix thoroughly.	

- Select the <**CHO**> test
- Insert analysis cuvette (blank value)
- Screw the cap from PE-bottle onto the cuvette, dissolve the starter reagent by inverting several times
- Press [ON/ENTER]
- Insert analysis cuvette again
- Wait for result

B. Measurement of series (up to 20 samples)

Pipette in round cuvettes:	
	Analysis
Sample	10 µL
Mix thoroughly.	

- Select the <**CHO**> test
- Insert the analysis cuvettes one after another (blank values)
- Screw the caps from PE-bottle onto the cuvettes, dissolve the starter reagent by inverting several times
- Press [ON/ENTER]
- Insert the first analysis cuvette **immediately** again
- Wait for result
- Insert the other analysis cuvettes one after another in the same order as of the blank value measurement
- Results of the respective analysis cuvette can be read immediately

Quality assurance
For quality assurance we recommend universal control sera from company Roche, www.roche.de:
PreciControl ClinChem Multi 1 / Multi 2 (4 x 5 mL)
Order-No.: 05 947 626 190 / 05 947 774 190
Ref.: Roche / Hitachi analyzers,
Method: CHOD-PAP stand. ID/MS

Clinical interpretation
The following values are recommended to assess the risk factor of cholesteremia:[3)]

	mg/dL	mmol/L
Low risk	> 200	> 5.2
High risk	> 260	> 6.7

Summary
Cholesterol pertains to the essential elements of cell membranes. Furthermore, it is the initial substance for the synthesis of steroid hormones and bile acids. Circa 25 % derive from nutrition. The rest is synthesised in the organism. Cholesterol is carried in the plasma as a lipoprotein complex due to its inability to solubilise in water.

Indications / diagnostic significance:[1)]
- Early diagnosis of the risk of atherosclerosis
- Control of lipid lowering therapies

The determination of cholesterol as a whole is counted among the basis programme of cardiovascular preventive medical checkups. According to the recommendations of the European Atherosclerosis Society, a cholesterol as a whole count of 200 mg/dL is classified as marginal value whose exceeding initially means a moderately, then intensely arisen risk of atherosclerosis.[3)] This risk increases because of factors like smoking and hypertension. The determination of the cholesterol proportions, which are associated with the lipoprotein fractions HDL and LDL, allows further risk evaluation.

In order to determine cholesterol as a whole the CHOD-PAP method is applied without exception nowadays. This method forms the basis of the Diaglobal test. The non-enzymatical Liebermann-Burchard reaction in turn has become irrelevant for routine diagnostics.

Measurement principle
The cholesterol esters are decomposed enzymatically. After this the free cholesterol becomes oxidised by means of the cholesteroloxidase (CHOD) and the generated H_2O_2 is converted into a dye through a PAP reaction.[4)]

$$\text{Cholesterol esters} + H_2O \xrightarrow{\text{Cholesterol-esterase}} \text{Cholesterol} + \text{fatty acids}$$

$$\text{Cholesterol} + O_2 \xrightarrow{\text{Cholesterol-oxidase}} \text{Cholestenon} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{4-Chlorphenol} + \text{4-Aminophenazone} \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \text{Quinonimine dye}$$

The concentration of the quinonimine dye is a measure for the cholesterol concentration in the sample and is measured photometrically. The end point of the reaction is identified automatically by the photometer.

Performance parameters
Specificity / interferences[5)]
Too high values because of haemoglobin (> 2.0 g/L), no interference due to lipaemia, ascorbic acid in physiological concentrations (< 50 mg/dL) and bilirubin (< 15 mg/dL). Pharmaceutical interferences: low values due to methyldopa (> 50 mg/L) and novaminsulfon (>150 mg/L) in concentrations above the therapeutic field.

Inaccuracy
The reproducibility was checked using human and control samples.

In series [n = 20]	Average [mg/dL]	Standard deviation [mg/dL]	VK [%]
EDTA blood	188	5	2.5
Serum 1	201	3	1.5
Serum 2	402	5	1.3
From day to day [n = 20]	**Average [mg/dL]**	**Standard deviation [mg/dL]**	**VK [%]**
Serum 1	199	3	1.6
Serum 2	398	6	1.5

Analytic sensitiveness
Lower detection limit: 20 mg/dL (0.52 mmol/L)

Comparison of methods
A comparison of the Diaglobal test CHO 142 (y) and a commercially available test (x) based on the CHOD-PAP method as well as a comparison between values which were determined with blood (y) and plasma (x) of the respectively same proband resulted in the following correlation data according to the Passing/Bablok[6)] process:

a) plasma
y = 0,990x + 3,5
r = 0,997
n = 60

b) EDTA blood / plasma
y = 1,000x + 1,0
r = 0,988
n = 85

Concentration range: 94 - 501 mg/dL

Information on disposal
Waste code number 180106:
The contents of the test kit are classified as hazardous waste. Do not allow the reagent to enter surface water or the sewage system.
Dispose of in accordance with regulatory requirements.
Uncontaminated and completely empty packaging may be recycled.

Bibliography
1. Thomas L. Labor und Diagnose. 4th edition. Marburg: Die Medizinische Verlagsgesellschaft 1995: 200
2. http://www.diaglobal.de/de/service/downloads/index.html
3. Study Group, European Atherosclerosis Society. Eur Heart J. 1988; The recognisation and management of hyperlipidemia in adults.
4. Allain CC. Clin Chem 1974; 20:470
5. Sonntag O. Arzneimittelinterferenzen. Stuttgart, New York: Thieme Verlag, 1985:24
6. Passing H, Bablok W. A new biometric procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. J Clin Chem Clin Biochem. 1983; 21:709-720