HDL-Cholesterin

Reagenz zur quantitativen In-vitro-Bestimmung von HDL-Cholesterin im Blut

HDL 321

Best. Nr. **HDL 321**
Inhalt: 20 Tests
20 Pipettenspitzen, 500µL
Zusätzlich erforderlich:
CHO 142 zur Bestimmung des Gesamt-Cholesterins

Methode
Cholesterin-Bestimmung im Überstand nach Fällung der LDL und VLDL mittels Polywolframsäure (PWS) und Magnesiumionen [1)]

Probenmaterial
Kapillarblut oder venöses EDTA-Blut (frisch)
Kapillarblut sofort in das Reaktionsgefäß “R” geben.
Haltbarkeit der Probe im Reaktionsgefäß “R”:
bei +15 bis +25°C: 6 Stunden

Reagenz
Inhalt / Konzentrationen der gebrauchsfertigen Lösung:
1. Startreagenz (Kappen in der PE-Flasche)
   Cholesterinoxidase (CHOD) aus Brevibacterium > 350 U/L,
   Peroxidase (POD) > 4kU/L, 4-Aminophenazon 0,20 mmol/L
2. Puffer (vorpipettiert in Rundküvetten)
   Lipoproteinlipase/Cholesterinesterase aus Mikroorg. >1200 U/L,
   4-Chlorphenol 13,5 mmol/L, Natriumazid <0,1 %,
   Triton X-100 < 1%, PIPES-Puffer
   pH 7,6, 113 mmol/L
3. Fällungsreagenz (Reaktionsgefäße “R”)
   Natriumchlorid 154 mmol/L, Magnesiumchlorid 18,9 mmol/L,
   Phosphorwolframsäure 0,26 mmol/L

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

Messgerät:	Vario Photometer Diaglobal
Messwellenlänge:	520nm
Temperatur:	Raumtemperatur

Zusätzlich erforderlich: Minizentrifuge

Messbereich
10 - 120 mg/dL (0,1 - 3,1 mmol/L)

Hinweis
Die Messung des Gesamt- und HDL-Cholesterins erfolgt gemeinsam im Menü <CHO/HDL>. Hierbei können die bei der HDL-Bestimmung anfallenden Wartezeiten zur Bestimmung des Gesamt- Cholesterins genutzt werden.

Neben Einzelmessungen sind auch kleine Serien (bis n = 6) durchführbar.

Arbeitsanleitung
- 60µL Kapillarblut aus der Fingerbeere oder dem Ohrläppchen entnehmen und in das Reaktionsgefäß “R” mit vorpipettiertem Fällungsreagenz stellen. Durch kräftiges Schütteln das Blut in die Reagenzlösung überführen.
- Reaktionsgefäß “R“ 5 Minuten stehen lassen.
- In Minizentrifuge einsetzen und 5 Minuten zentrifugieren.
- 500µL Überstand mit Pipette entnehmen, in eine Rundküvette HDL 321 pipettieren.
- Auf diese Rundküvette Kappe mit Startreagenz aufschrauben und mischen.
  Nach 5 Minuten ist die Küvette (= Analysenküvette) messbereit.
- Test <CHO/HDL> anwählen.
- Zunächst Gesamt-Cholesterin bestimmen, siehe Packungsbeilage CHO 142.
- Anschließend HDL-Cholesterin messen:
- Nullpunkt mit einer unbearbeiteten Einzeltestküvette HDL 321 aus der Testpackung einstellen.
- Küvette entfernen.
- Die vorbereitete Analysenküvette nach 5 Minuten in das Photometer einsetzen.
- Ergebnis ablesen.

Berechnung
Konzentration c des HDL-Cholesterins im Plasma:
c (mg/dL) = F1 x Ext x 1/(1-HCT)

F1 = Berechnungsfaktor, HCT = Hämatokrit
Die Berechnungsformel ist im Vario Photometer einprogrammiert. Der HCT-Wert muß nicht gesondert ermittelt werden, da bei der Bestimmung des Gesamt-Cholesterins eine Messgröße anfällt, die dem HCT-Wert proportional ist und von der Gerätesoftware für die HDL-Berechnung genutzt wird.

Qualitätssicherung
Für die Qualitätssicherung empfehlen wir die Spezial-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
Methode: Fällung mit Phosphorwolframsäure und Magnesiumionen

Referenzwerte[3)]

	Kein Risiko	Mäßiges Risiko	Hohes Risiko	
Männer	> 55	55 - 35	< 35	mg/dL
	> 1,45	1,45 - 0,90	< 0,90	mmol/L
Frauen	> 65	65 - 45	< 45	mg/dL
	> 1,68	1,68 - 1,15	< 1,15	mmol/L

Zusammenfassung
Die HDL (High density lipoproteins) sind für den Rücktransport von Cholesterin aus den peripheren Zellen in die Leber verantwortlich. Klinisch bedeutsam ist die Bestimmung des HDL-Cholesterins.

Indikationen / Diagnostische Bedeutung:[3)]
- Früherkennung eines Arteriosklerose-Risikos (Bestimmung des antiatherogenen Cholesterinanteils)
- Therapiekontrolle bei Behandlung mit lipidsenkenden Medikamenten
- Erfolgskontrolle von Aktivitäten im Fitness- und Freizeitsport

Erhöhte HDL-Konzentrationen im Serum haben einen protektiven Effekt auf die koronare Herzkrankheit, während erniedrigtes HDL-Cholesterin, vor allem in Verbindung mit erhöhten Triglyceriden, das kardiovaskuläre Risiko erhöht. Bei der Behandlung mit lipidsenkenden Medikamenten muß eine Abnahme der HDL vermieden werden. Für die Prävention ist von Bedeutung, daß Ausdauersport zu einer Erhöhung des HDL-Cholesterins führt.
Zur Bestimmung stehen unterschiedliche Methoden (Ultrazentifugation, HPLC, Elektrophorese, Präzipitationsmethoden) zur Verfügung. Im Routinebetrieb haben insbesondere die Präzipitationsmethoden Bedeutung erlangt.
Der Diaglobal-Test HDL 321 wurde speziell für die Untersuchung von Kapillarblut entwickelt und ermöglicht die Bestimmung des HDL-Cholesterins vor Ort.

Messprinzip
VLDL (very low density lipoproteins) und LDL (low density lipoproteins) werden in der verdünnten Probe durch Polywolframsäure (PWS) und Magnesiumionen präzipitiert. Nach Zentrifugation, die zur Separation des Präzipitats und der Erythrocyten führt, wird das im Überstand verbleibende HDL-Cholesterin bestimmt [1)]
Die Bestimmung erfolgt nach der CHOD-PAP-Methode.
Bei der Ergebnisberechnung wird der Hämatokritwert der Probe berücksichtigt.

Leistungsmerkmale
Spezifität / Interferenzen[4)]
Bilirubin (> 10 mg/dL) und starke Hämolyse (> 2,0 g/dL) stören.
Weitere Informationen s. Packungsbeilage CHO 142.
Bei Triglyceridwerten > 400 mg/dL (4,56 mmol/L) ist eine vollständige Präzipitation nicht mehr gewährleistet.

Unpräzision
Die Reproduzierbarkeit wurde mit venösem Humanblut überprüft.

In der Serie [n = 20]	Mittelwert [mg/dL]	Standard-Abweichung [mg/dL]	VK [%]
Probe 1	34,5	1,3	3,8
Probe 2	60,9	1,7	2,8
Unterbrochene Serie [n = 20]	**Mittelwert [mg/dL]**	**Standard-Abweichung [mg/dL]**	**VK [%]**
Probe 1	36,2	1,6	4,3
Probe 2	59,8	2,1	3,5

Analytische Sensitivität
Untere Nachweisgrenze: 10 mg/dL (0,5 mmol/L)

Methodenvergleich
Ein Vergleich des Diaglobal-Tests HDL 321 (y, Probenmaterial Blut) mit einem anderen, auf der PWS- Methode basierenden, kommerziell erhältlichen Test (x, Probenmaterial Plasma) ergab nach dem Verfahren von Passing/Bablok[5)] die Korrelation:
y = 0,947x + 3,29
r = 0,990
n = 40
Konzentrationsbereich: 30,0 - 110 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. Assmann G, Schriewer H, Schmitz G et al. Qualification of high density lipoprotein cholesterol by precipitation with phosphotungstic acid/$MgCl_2$. Clin Chem 1983:29:2026-2030
2. http://www.diaglobal.de/de/service/downloads/index.html
3. Thomas L. Labor und Diagnose. 4.Aufl. Marburg: Die Medizinische Verlagsgesellschaft 1995: 207
4. Sonntag O. Arzneimittelinterferenzen. Stuttgart, New York: Thieme Verlag, 1985:37
5. 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

HDL Cholesterol

CE

Reagent for quantitative In-vitro-determination of HDL-cholesterol in blood

HDL 321

Order No. **HDL 321**
Contents: 20 tests
20 pipette tips, 500 µL

Additionally required:
CHO 142 for the determination of the Total-cholesterol

Method
Cholesterol determination in the supernatant after the precipitation of LDL and VLDL by means of poly tungstic acid and magnesium ions.[1)]

Sample material
Capillary or venous EDTA blood (fresh).
Set capillary blood immediately in reaction tube "R".
Stability of the sample in reaction tube "R":
at +15 to +25°C: 6 hours

Reagent
Content / concentrations:
1. Starter reagent (caps in PE-bottle)
   Cholesterol oxidase (CHOD) from brevi bacterium > 350 U/L, Peroxidase (POD) > 4kU/L, 4-Aminophenazone 0.20 mmol/L
2. Buffer solution (pre-portioned in round cuvettes)
   Lipoprotein lipase/cholesterol esterase from microorg. >1200 U/L, 4-Chlorophenol 13.5 mmol/L, Sodium azide <0.1 %, Triton X-100< 1%, PIPES-buffer pH 7.6, 113 mmol/L
3. Precipitation reagent (reaction tube "R")
   Sodium chloride 154 mmol/L, Magnesium chloride 18.9 mmol/L, Phosphotungstic acid 0.26 mmol/L

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.

Measurement conditions

Measurement device:	Vario Photometer Diaglobal
Meas. wavelength:	520nm
Temperature:	Room temperature
Additionally required:	Mini centrifuge

Measurement range
10 - 120 mg/dL (0.1 - 3.1 mmol/L)

Tips
The determination of cholesterol as a whole as well as of HDL cholesterol happens in the menu <HDL>. Here, the waiting periods which come about during the HDL 321-measurement may be used for the determination of cholesterol as a whole. Besides single measurements, the measurement of small series (up to n = 6) is feasible as well.

Working instructions
- Withdraw 60µL capillary blood from finger pulp or earlobe and insert in reaction tube "R" with pre-pipetted precipitation reagent. Transfer blood in reagent solution by mixing strongly.
- Allow reaction tube "R" to stand for 5 minutes.
- Insert reaction tube "R" in Mini centrifuge and centrifuge for 5 minutes.
- Pipette 500µL supernatant in round cuvette HDL 321.
- Screw cap with starter reagent onto this round cuvette and mix.
  Cuvette (= analysis cuvette) is ready to be measured after 5 minutes.
- Select the <CHO/HDL> test.
- First determine cholesterol as a whole, see package insert CHO 142.
- Afterwards measure HDL cholesterol.
- Set the photometer's zero point (blank value) using a non-processed single test cuvette HDL 321 from the kit.
- Remove cuvette.
- After 5 minutes waiting time insert the prepared analysis cuvette into photometer.
- Read the result.

Calculation
Concentration c of the HDL cholesterol in the plasma:
c (mg/dL) = F1 x ABS x 1/(1-HCT)

F1 = calculation factor, HCT = Haematocrit
The calculation formula is programmed in the Vario Photometer. There is no need for a separate determination of the HCT count. The determination of cholesterol as a whole causes a measurand that is proportional to the HCT count and used by the device's software for the HDL calculation.

Quality assurance
For quality assurance we recommend special 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
Method: Precipitation with phosphotungstic acid and magnesium ions

Reference values[3)]

	No risk	Moderate risk	High risk	
Men	> 55	55 - 35	< 35	mg/dL
	> 1.45	1.45 - 0.90	< 0.90	mmol/L
Women	> 65	65 - 45	< 45	mg/dL
	> 1.68	1.68 - 1.15	< 1.15	mmol/L

Summary
The HDL (High density lipoproteins) are responsible for the transportation of cholesterol from peripheral cells back to the liver. The determination of HDL cholesterol is significant clinically.

Indications / diagnostic significance:[3)]
- Early diagnosis of arteriosclerotic risk (determination of the antiatherogen cholesterol ratio)
- Therapeutic control of treatment with lipid-lowering drugs
- Result checking of activities in the fitness sector and recreational sport

High HDL concentrations in serum have a protective effect on the coronary heart disease, whereas low HDL cholesterol - especially in association with high triglycerides - increases the cardiovascular risk. When medicating with lipid-lowering drugs, it is necessary to evoide a HDL decrease. For prevention it is important that endurance sport leads to an increase of HDL cholesterol.
Different determination methods are available (ultra centrifugation, HPLC, electro-phorese, precipitation methods). Especially the precipitation methods have become important in the routine.
The Diaglobal test HDL 321 was developed in particular for the examination of capillary blood and allows the determination of HDL cholesterol on location.

Measurement principle
VLDL (very low density lipoproteins) and LDL (low density lipoproteins) are precipitated by poly tungstic acid and magnesium ions in the diluted sample. The HDL cholesterol, which remains in the supernatant, is determined after centrifugation, which separates precipitate and erythrocytes.[1)]
The determination is based on the CHOD-PAP method.
When calculating the result, the haematocrit value of the sample is taken into consideration.

Performance parameters
Specificity / interferences[4)]
Bilirubin (> 10 mg/dL) and strong haemolysis (> 2.0 g/dL) interfere. For additional information see package insert CHO 013 / 015 and CHO 142 respectively.
A complete precipitation is not guaranteed anymore with triglyceride values > 400 mg/dL (4.56 mmol/L).

Inaccuracy
The reproducibility was checked using venous human blood.

In series [n = 20]	Average [mg/dL]	Standard deviation [mg/dL]	VK [%]
Sample 1	34.5	1.3	3.8
Sample 2	60.9	1.7	2.8
Interrupted series [n = 20]	**Average [mg/dL]**	**Standard deviation [mg/dL]**	**VK [%]**
Sample 1	36.2	1.6	4.3
Sample 2	59.8	2.1	3.5

Analytic sensitiveness
Lower detection limit: 10 mg/dL (0.5 mmol/L)

Comparison of methods
A comparison of the Diaglobal test HDL 321 (y, sample material blood) and another commercially available test (x, sample material plasma) based on the PWS method resulted in the following correlation according to the Passing/Bablok[5)] process:

y = 0.947x + 3.29
r = 0.990

n = 40
Concentration range: 30.0 - 110 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. Assmann G, Schriewer H, Schmitz G et al. Qualification of high density lipoprotein cholesterol by precipitation with phosphotungstic acid/$MgCl_2$. Clin Chem 1983:29:2026-2030
2. http://www.diaglobal.de/de/service/downloads/index.html
3. Thomas L. Labor und Diagnose. 4.Aufl. Marburg: Die Medizinische Verlagsgesellschaft 1995: 207
4. Sonntag O. Arzneimittelinterferenzen. Stuttgart, New York: Thieme Verlag, 1985:37
5. 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