Triglyceride

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

TRI 142

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

Methode
Enzymatischer Farbtest, GPO-PAP-Methode[1] ohne Berücksichtigung des freien Glycerins.

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 Triglyceride 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)
   L-Glycerin-3-phosphat-oxidase (GPO) aus Mikroorganismen > 3,5 kU/L, Glycerokinase (GK) aus Bacillus stearothermophilus > 0,9 kU/L, Peroxidase (POD) >3,5 kU/L, ATP 2,4 mmol/L, 4-Aminophenazon 0,15 mmol/L
2. Pufferlösung (vorportioniert in Rundküvetten)
   Lipoproteinlipase aus Mikroorg. > 7,5 kU/L, 2,4-Dichlorphenol 4 mmol/L, Natriumazid < 0,1 %, Triton X-100 < 1%, PIPES-Puffer 50 mmol/L, pH 7,5

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.[3]

Lagerung und Haltbarkeit
Die Testreagenzien 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: Diaglobal Photometer
Messwellenlänge: 520nm
Temperatur: Raumtemperatur
Der Algorithmus zur Berechnung des Analysenergebnisses ist in den genannten Photometern einprogrammiert.

Messbereich
20 - 2000 mg/dL (0,2 - 22,8 mmol/L)

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

A. Einzelmessung

In Rundküvette pipettieren:	
	Analyse
Probe	10 µL
Gut mischen.	

- Test <**TRI**> anwählen
- Küvette mit Probe in das Photometer einsetzen (Nullpunkteinstellung)
- Kappe aus der PE-Flasche auf die Küvette aufschrauben und Startreagenz durch mehrmaliges Kippen aus der Kappe 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 <**TRI**> anwählen
- Küvetten mit Probe nacheinander in das Photometer (Nullpunkteinstellungen)
- Kappen aus der PE-Flasche auf die Küvetten aufschrauben und Startreagenz durch mehrmaliges Kippen aus den Kappen 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: GPO – PAP

Referenzwerte
Zur Erkennung einer Hypertriglyceridämie werden folgende obere Grenzwerte empfohlen[1]:

	mg/dL	mmol/L
Verdächtig ab	150	1,71
Erhöht ab	200	2,29

Zusammenfassung
Nach Mahlzeiten steigt die Triglycerid-Konzentration im Blut stark an, da die mit der Nahrung aufgenommenen Triglyceride relativ schnell als Chylomikronen in das Blut gelangen. Diagnostische Aussagen können nur mit Werten aus Nüchternblut getroffen werden.

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

Erhöhte Triglyceridwerte finden sich häufig auch bei Diabetes mellitus, chronischer Niereninsuffizienz, Leberschädigung, Pankreatitis und Alkoholmißbrauch und können Zeichen einer bislang nicht erkannten Krankheit sein.

Die Bestimmung der Triglyceride erfolgt heute ausnahmslos enzymatisch über das durch hydrolytische Spaltung freigesetzte Glycerin.[2] Die früher weitverbreitete UV-Methode, bei der die NADH-Abnahme nach einer mehrstufigen Enzymreaktion gemessen wurde, ist inzwischen durch die GPO-PAP-Methode,[4] die auch dem Diaglobal-Test zugrunde liegt, verdrängt worden.

Messprinzip

$$\text{Triglyceride} + H_2O \xrightleftharpoons{\text{Lipase}} \text{Glycerin} + \text{freie Fettsäuren}$$

$$\text{Glycerin} + ATP \xrightarrow{\text{GK}} \text{Glycerin-3-phosphat} + ADP$$

$$\text{Glycerin-3-phosphat} + O_2 \xrightarrow{\text{GPO}} \text{Dihydroxyaceton-Phosphat} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{2,4-Dichlorphenol} + \text{4-Aminophenazon} \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \text{Chinoniminfarbstoff}$$

GK = Glycerokinase, GPO = Glycerin-3-phosphat-oxidase

Die Konzentration des Chinoniminfarbstoffes ist ein Maß für die Triglyceridkonzentration im Blut bzw. Serum/ Plasma und wird photometrisch bei 520 nm gemessen.
Das Erreichen des Endpunktes der Reaktion wird vom Messgerät selbsttätig erkannt.
Im Serum enthaltenes freies Glycerin, dessen Konzentration beim Gesunden einem Triglyceridwert von 10 mg/dL entspricht, wird mitbestimmt.

Leistungsmerkmale
Spezifität / Interferenzen[1,5]
Erhöhte Werte durch freies Glycerin, keine Störung durch Ascorbinsäure in physiologischen Konzen-trationen (< 30 mg/dL) und Bilirubin (< 10 mg/dL) sowie durch niedrige und hohe Hämoglobin-Spiegel. Arzneimittelinterferenzen[5]: Erniedrigte Werte durch Acetylsalicylsäure (> 75 mg/L), keine Störung durch Methyldopa und Novaminsulfon in therapeutischen Konzentrationen.

Unpräzision
Die Reproduzierbarkeit wurde mit Human- und Kontrollproben überprüft.

In der Serie [n = 20]	Mittelwert [mg/dL]	Standard-Abweichung [mg/dL]	VK [%]
EDTA-Blut	102	4,0	3,9
Serum 1	125	3,1	2,5
Serum 2	197	3,5	1,8
Von Tag zu Tag [n = 20]	**Mittelwert [mg/dL]**	**Standard-Abweichung [mg/dL]**	**VK [%]**
Serum 1	120	4,0	3,2
Serum 2	199	4,1	2,1

Analytische Sensitivität
Untere Nachweisgrenze: 20 mg/dL (0,2 mmol/L)

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

a) Serum
y = 1,019x - 5,27
r = 0,999
n = 44

b) EDTA-Blut / Plasma
y = 1,002 + 0,82
r = 0,995
n = 73

Konzentrationsbereich: 45 - 1500 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: 203
2. Klotsch SE, McNamara JR. Triglyceride measurements: a review of methods and interferences. Clin Chem 1990; 36:1605
3. http://www.diaglobal.de/de/service/downloads/index.html
4. Fossati P, Principe L. Clin Chem 1982; 28:2077
5. Sonntag O. Arzneimittelinterferenzen. Stuttgart, New Yorck: Thieme Verlag, 1985:37
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

Triglycerides

CE

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

TRI 142

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

Method
Enzymatic colorimetric test, GPO-PAP method[1] without considering free glycerol.

The determination may be carried out with blood as well as serum/plasma. Blood is immediately and completely haemolysed by the reagent. The result obtained from blood also refers to plasma.

Sample material
Capillary or EDTA venous blood.
Serum, haeparinized or EDTA plasma.
Pipette capillary blood immediately into single test cuvette.
Stability of triglycerides in buffer solution:
at + 2 to + 8°C: 8 hours
at + 15 to + 30°C: 4 hours

Reagents
Contents / concentrations of the ready-to-use solution:
1. Starter reagent (screw caps)
   L-glycerol-3-phosphate-oxidase (GPO) from microorganisms > 3.5 kU/L, Glycerokinase (GK) from bacillus stearothermophilus > 0.9 kU/L, Peroxidase (POD) > 3.5 kU/L, ATP 2.4 mmol/L, 4-Aminophenazone 0.15 mmol/L
2. Buffer solution (pre-portioned in round cuvettes)
   Lipoprotein lipase from microorg. > 7.5 kU/L, 2.4-Dichlorophenol 4 mmol/L, Sodium azide < 0.1 %; Triton X-100 < 1%, PIPES-buffer 50 mmol/L, pH 7.5

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.[3]

Storage and shelf life
The test 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.

Measurement conditions

Measurement device:	Diaglobal Photometer
Meas. wavelength:	520nm
Temperature:	Roomtemperature

The algorithm to compute the analysis result is coded in the above-named photometers.

Measurement range
20 - 2000 mg/dL (0.2 - 22.8 mmol/L)

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

A. Single measurement

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

- Select the <**TRI**> 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 <**TRI**> 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: GPO – PAP

Reference values
For recognition of hypertriglyceridemia the following upper marginal values are recommended.[1]

	mg/dL	mmol/L
Suspicious from	150	1.71
Elevated from	200	2.29

Summary
After meals the triglyceride concentration in blood increases heavily since triglycerides, which are absorbed through nourishment, reach relatively fast the blood as chylomicrons. Diagnostic conclusions may only be drawn with values from fasting blood.

Indications / diagnostic significance:[1]
- Early recognition of arteriosclerotic risk
- Classification of hyperlipoproteinemia
- Control of lipid-lowering therapies

Elevated triglyceride counts are also often found with diabetes mellitus, chronic renal insufficiency, liver damage, pancreatitis, and alcoholic excess. They can also be a signal for a disease that has been unrecognised so far.

Today the determination of triglycerides is carried out without exception enzymatically over glycerol that has been released by hydrolytic cleavage.[2] The former widespread UV method, where the NADH decrease used to be measured after a multilevel enzymatic reaction, has been displaced by the GPO-PAP method[4], which the Diaglobal test is also based on.

Measurement principle

$$\text{Triglycerides} + H_2O \xrightarrow{\text{Lipase}} \text{Glycerol} + \text{Free fatty acids}$$

$$\text{Glycerol} + ATP \xrightarrow{\text{GK}} \text{Glycerol-3-phosphate} + ADP$$

$$\text{Glycerol-3-phosphate} + O_2 \xrightarrow{\text{GPO}} \text{Dihydroxyacetone Phosphate} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{2,4-Dichlorophenol} + \text{4-Aminophenazone} \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \text{Quinonimine dye}$$

GK = Glycerokinase, GPO = Glycerol-3-phosphate-oxidase

The concentration of the quinonimine dye is a measure for the triglyceride concentration in blood and serum/ plasma respectively and is measured photometrically at 520 nm.
Reaching the end point of the reaction is identified automatically by the device itself.
Free glycerol in serum, whose concentration corresponds to a triglyceride value of 10 mg/dL if the person is healthy, is measured, too.

Performance parameters
Specificity / interferences[1,5]
Elevated values because of free glycerol, no interferences due to ascorbic acid in physiological concentrations (< 30 mg/dL) and bilirubin (< 10 mg/dl) as well as due to a low and high haemoglobin level. Interferences due to pharmaceuticals[5]: lowered values due to acetylsalicylic acid (> 75 mg/L), no interferences due to methyldopa and novaminsulfon in therapeutic concentrations.

Inaccuracy
The reproducibility was checked using human and control samples.

In series [n = 20]	Average [mg/dL]	Standard deviation [mg/dL]	VK [%]
EDTA blood	102	4.0	3.9
Serum 1	125	3.1	2.5
Serum 2	197	3.5	18
From day to day [n = 20]	**Average [mg/dL]**	**Standard deviation [mg/dL]**	**VK [%]**
Serum 1	120	4.0	3.2
Serum 2	199	4.1	2.1

Analytic sensitiveness
Lower detection limit: 20 mg/dL (0.2 mmol/L)

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

a) Serum	b) EDTA blood / plasma
y = 1,019x - 5,27	y = 1,002 + 0,82
r = 0,999	r = 0,995
n = 44	n = 73

Concentration range: 45 - 1500 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: 203
2. Klotsch SE, McNamara JR. Triglyceride measurements: a review of methods and interferences. Clin Chem 1990; 36:1605
3. http://www.diaglobal.de/de/service/downloads/index.html
4. Fossati P, Principe L. Clin Chem 1982; 28:2077
5. Sonntag O. Arzneimittelinterferenzen. Stuttgart, New Yorck: Thieme Verlag, 1985:37
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