

Determinazione Quantitativa del Colesterolo nel Siero o Plasma. Metodo CHOD-PAP enzimatico colorimetrico, endpoint.

**REF CC1132** R1: 4x60 mL + R2: 1x3 mL (standard)

**REF CC1130** R1: 4x100mL+ R2: 1x3 mL (standard)

## PRINCIPIO DEL METODO

Mediante una idrolisi enzimatica, l'enzima Colesterolo Esterasi (CHE) libera il Colesterolo dagli Acidi Grassi. Questa frazione, unitamente alla parte libera nel plasma, viene ossidata mediante enzima Colesterolo Ossidasi (CHO) producendo Perossido d'Idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Quest'ultimo composto, mediante reazione catalizzata dall'enzima Perossidasi (POD) reagisce con 4-Ammino-antipirina per formare il rosso quinone che può essere misurato fotometricamente (reazione di Trinder). La misura di tale assorbanza (densità ottica) è direttamente proporzionale al Colesterolo inizialmente contenuto nel campione in esame. L'uso di un calibratore a titolo noto rende possibile una analisi quantitativa.

CHE

Colesterolo esterificato + H<sub>2</sub>O -----> Colesterolo + Acidi Grassi

CHOD

Colesterolo + O<sub>2</sub> -----> Colesten-3-one + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

POD

2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 4-Aminoantipirina + Fenolo -----> Quinone-imina + 4 H<sub>2</sub>O

## SIGNIFICATO CLINICO

Il colesterolo esiste nel sangue umano come uno sterolo libero ed in forma esterificata. La conoscenza del livello di lipidi (colesterolo e trigliceridi) nel plasma, insieme a quello delle lipoproteine ad alta e bassa densità (HDL, LDL) aiuta nel rilevamento e nella diagnosi di molti disordini metabolici ad alto rischio.

Lo squilibrio nel livello plasmatico di lipoproteine porta ad una iper-lipoproteinemia, un gruppo di disordini che tocca i livelli lipidici nel siero, causando patologie alle coronarie (CHD) e aterosclerosi, condizioni in cui i livelli di colesterolo sono importanti strumenti nella loro diagnosi e classificazione.

L'itterizia di tipo ostruttivo è abitualmente accompagnata da elevato colesterolo totale nel siero con una normale frazione esterificata. Il diabete, l'ipotiroidismo e alcuni tipi di patologie infantili sono altre patologie che possono mostrare lo stesso disturbo del colesterolo.

Valori bassi del colesterolo totale con frazioni esterificate normali sono presenti soprattutto nell'ipotiroidismo e nella malnutrizione.

## COMPOSIZIONE REAGENTI

### Reagente (R1)

Tampone di Good, pH 6.7	50 mmol/L
Fenolo	5 mmol/L
4-Aminoantipirina	0.3 mmol/L
Colesterolo Esterasi (CHE)	≥ 300 U/L
Colesterolo Ossidasi (CHOD)	≥ 200 U/L
Perossidasi (POD)	≥ 1200 U/L

### Reagente (R2)

Standard Colesterolo: valore in etichetta

## PREPARAZIONE REAGENTI E STABILITA'

Reagenti liquidi e pronti all'uso, stabili fino alla data di scadenza riportata, se conservati come riportato in etichetta e si evitano contaminazione, evaporazioni ed esposizione prolungata alla luce diretta.

Non congelare i reagenti.

Scartare il reagente se appaiono segni di deterioramento come presenza di particelle e torbidità oppure mancato recupero dei valori di sieri di controllo certificati oppure l'Assorbanza del Bianco Reagente > 0,150 a 546 nm in cuvetta da 1 cm.

Dopo l'apertura dei flaconi, si consiglia di prelevare il volume necessario, di richiudere immediatamente i flaconi e di riporli in frigo al fine di evitare contaminazione, degradazione da luce diretta ed evaporazione.

## CAMPIONI

Siero, plasma da eparina o da EDTA

Evitare campioni emolizzati o lipemici. Separare il siero dal coagulo rapidamente.

Stabilità: 3 giorni a 20 – 25 °C; 7 giorni a 2 – 8 °C; 3 mesi a -20 °C

Scartare campioni contaminati. Congelare una sola volta.

## PROCEDURA

Lunghezza d'onda:	546 nm (510-550)
Temperatura:	37° C
Misura:	contro acqua distillata

### Pipettare come segue

Reagente 1	1000 µL
Campione, Std. / Cal / H <sub>2</sub> O	10 µL

Miscelare, incubare per 5 min. Leggere l'assorbanza (Abs) entro 60 min.

## CALCOLO

$$\text{Colesterolo} = \frac{\text{Abs Campione} - \text{Abs Bianco Reagente}}{\text{Abs Std/Cal} - \text{Abs Bianco Reagente}} \times \text{Conc. Std/Cal}$$

Fattore Conversione: Colesterolo [mg/dL] x 0.02586 = Colesterolo [mmol/L]

## CALIBRAZIONE

I risultati dipendono dalla accuratezza della calibrazione, dal corretto settaggio del test sullo strumento, dal giusto rapporto volumetrico reagente/campione e dalla corretta temperatura di analisi.

In alternativa allo standard accluso alla confezione, è possibile utilizzare il Calibratore di **MTD Diagnostics**:

**Chemistry Multicalibrator - REF CAL1010 (10 x 3 mL).**

## CONTROLLO QUALITA'

Sieri di controllo normali e patologici a concentrazione nota, devono essere analizzati regolarmente in ogni seduta analitica.

Utilizzare il materiale di controllo di qualità di MTD Diagnostics:

**Chemistry Control N - REF CNN1010** 10x5 mL (Livello 1)

**Chemistry Control P - REF CNP1020** 10x5 mL (Livello 2)

## VALORI DI RIFERIMENTO

Accettabile	≤ 200 mg/dL (5.2 mmol/L)
Limite alto rischio	200 – 240 mg/dL (5.2 – 6.2 mmol/L)
Alto rischio	> 240 mg/dL (>6.2 mmol/L)

The European Task Force on Coronary Prevention raccomanda di abbassare la concentrazione di Colesterolo Totale a meno di 190 mg/dL (5.0 mmol/L) e di LDL-Colesterolo a meno di 115 mg/dL (3.0 mmol/L). Ogni laboratorio dovrebbe stabilire un range di valori attesi in base alla propria popolazione di pazienti e, se necessario, determinare il proprio intervallo di riferimento. A fini diagnostici, i risultati devono sempre essere valutati insieme alla storia medica del paziente, all'esame clinico e ad altri risultati.

## PRESTAZIONI

### PRECISIONE:

Livello basso: Campioni= 20; Media = 135; D.S. = 1,36; CV = 1,01%  
 Livello alto: Campioni= 20; Media = 218; D.S. = 3,1; CV = 1,41%

**ACCURATEZZA (CORRELAZIONE):** Una comparazione tra questo metodo (x) ed un metodo certificato del commercio (y) ha dato la seguente correlazione:

$$y = 1.005 x - 0.281 \quad r = 0.999$$

**SENSIBILITA':** 7 mg/dL

**LINEARITA':** 7 – 600 mg/dL

## INTERFERENZE E SPECIFICITA'

Non sono state osservate interferenze con Emoglobina fino a 500 mg/dL, con lipemia fino a 1000 mg/dL di Trigliceridi, con Bilirubina fino a 20 mg/dL. Per ulteriori informazioni sulla interferenza di sostanze, fare riferimento a Young DS.

## NOTE

- Il reagente può essere utilizzato con differenti strumenti. Ogni applicazione su strumenti dovrebbe essere validata per dimostrare che i risultati coincidano con le caratteristiche e prestazioni del metodo. Si raccomanda di controllare periodicamente lo strumento. Contattare il proprio fornitore per ogni problema relativo alla metodica applicativa.
- La diagnosi clinica non dovrebbe essere effettuata sui risultati di un singolo test, ma dovrebbe essere integrata con dati clinici e di laboratorio.

## PRECAUZIONI

La miscela contiene:

FENOLO 5 mmol/L – CAS 108-95-2 T R23/24/25 (H331 – H301 – H311) - C R34 (H314)

4-AMINOANTIPYRINE 0.3 mmol/L – CAS 83-07-8 Xn R22 (H302)

SODIO AZIDE 0,7 gr/Lt – CAS 26628-22-8 ; N.EC. 247-852-1

H301 – Tossico se ingerito

H302 – Nocivo se ingerito

H311 – Tossico per contatto con la pelle.

H314 – Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari

H331 – Tossico se inalato

Il prodotto non contiene altre sostanze o miscele pericolose secondo la regolamentazione CE n° 1272/2008 (CLP) ovvero le loro concentrazioni sono tali da non essere considerate persistenti, bioaccumulanti o tossiche

(PBT). Pertanto, esso non è soggetto alla etichettatura speciale prevista dalla suddetta regolamentazione. Il prodotto è etichettato secondo la direttiva per la marcatura CE (98/79/CE). Sodio Azide inferiore a 0.1%.

Tuttavia, in osservanza alle normali norme di prudenza che ognuno deve osservare allorchè si maneggi qualunque sostanza chimica o reagente di laboratorio, in caso di contatto dei Reagenti con l'operatore, occorre applicare i seguenti interventi di primo soccorso:

S26 (P305 – P351 – P338): In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare il medico.

S28 (P302 – P352): In caso di contatto con la pelle, lavarsi immediatamente ed abbondantemente.

S36/37/39 (P280): Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.

S46 (P301 – P310): In caso d'ingestione consultare immediatamente il medico e mostrargli il contenitore o l'etichetta. Se la vittima è cosciente, lavare la bocca con acqua.

S56 (P273): Smaltire questo materiale e relativi contenitori in un punto di raccolta autorizzato per rifiuti pericolosi o speciali, applicando la legislazione vigente.

S63 (P304 – P340): In caso di incidente per inalazione, allontanare l'infortunato dalla zona contaminata e mantenerlo a riposo.

Tutti i campioni in esame, calibratori e controlli devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo capace di trasmettere HIV ed epatiti.

PER OGNI ALTRA INDICAZIONE, RICHIEDERE LA SCHEDA DI SICUREZZA COMPLETA AL PRODUTTORE.

## SIMBOLOGIA

	Marchio CE (prodotto conforme ai requisiti della Dir. 98/79 CE)		
	Dispositivo medico diagnostico in vitro		Limiti temperatura di conservazione
	Consultare istruzioni per l'uso		Dimensione / numero test
	Numero di catalogo		Scadenza
	Numero di lotto		Fabricante

## BIBLIOGRAFIA

- Rifai N, Bachorik PS, Albers JJ. Lipids, lipoproteins and apolipoproteins. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia: W.B Saunders Company; 1999. p. 809-61.
- Recommendation of the Second Joint Task Force of European and other Societies on Coronary Prevention. Prevention of coronary heart disease in clinical practice. Eur Heart J 1998;19: 1434-503.
- Artiss JD, Zak B. Measurement of cholesterol concentration. In: Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH, eds. Handbook of lipoprotein testing. Washington: AACC Press, 1997:99-114.
- Deeg R, Ziegenhorn J. Kinetic enzymatic method for automated determination of total cholesterol in serum. ClinChem 1983; 29:1798-802.
- Schaefer EJ, McNamara J. Overview of the diagnosis and treatment of lipid disorders. In: Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH, eds. Handbook of lipoprotein testing. Washington: AACC press, 1997:25-48.