

## SAS-MX HDL

### Instructions For Use REF. 101000

SAS-MX HDL  
Fiche technique

SAS-MX HDL  
Anleitung

HDL SAS-MX  
Istruzioni per l'uso

SAS-MX HDL  
Instrucciones de uso

### Contents

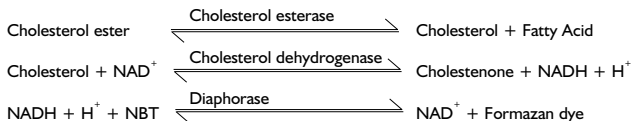
English .....	1
Français .....	6
Deutsch .....	11
Italiano .....	16
Español .....	21





**INTENDED PURPOSE**

The SAS-MX HDL Kit is intended for the separation and quantitation of high density lipoprotein (HDL) cholesterol from the other lipoprotein classes in serum or plasma by agarose gel electrophoresis and enzymatic staining of the cholesterol component of each lipoprotein according to the following reaction sequence:



The relationship of HDL Cholesterol to coronary heart disease (CHD) was reported by Barr et al. in 1951<sup>1</sup>, and Miller and Miller in 1975<sup>2</sup>. The work of Castelli et al.<sup>3,4</sup> focused attention on HDL Cholesterol assessment as the definitive laboratory test in determining the risk of CHD. The clinical recommendations from the National Cholesterol Education Program (NCEP) panels direct clinical laboratories to perform measurements of Total, HDL and LDL Cholesterols and Triglycerides<sup>7</sup>.

The cholesterol content of the lipoprotein fractions has been determined by ultracentrifugation<sup>8</sup>, selective precipitation<sup>9</sup>, and electrophoresis on various media<sup>10</sup>.

**WARNINGS AND PRECAUTIONS**

All reagents are for in-vitro diagnostic use only. Do not ingest or pipette by mouth any kit component. Refer to product safety data sheet for risk and safety phrases and disposal information.

**COMPOSITION****1. SAS-MX HDL Gel (x10)**

Contains agarose in a Tris / Barbital buffer with sodium azide as preservative. The gel is ready for use as packaged.

**2. SAS-MX HDL Buffer (1x 100ml)**

Contains Tris, barbital and sodium barbital buffer with sodium azide as preservative. Dilute the contents of the bottle to 1 litre with purified water and mix well.

**3. SAS-MX HDL Reagent (10x 1ml)**

Contains those compounds required for the identification of cholesterol according to the reaction sequence shown above. See STEP-BY-STEP-PROCEDURE for reconstitution instructions.

**4. SAS-MX HDL Diluent (1x 27ml)**

Contains Triton X-100 in HEPES buffer, pH 6.9-7.1. The diluent is ready for use as packaged.

**5. Other Kit components**

Each kit contains Instructions For Use and sufficient Sample Application Templates, Blotters A, C and D to complete 10 gels.

## STORAGE AND SHELF LIFE

### 1. SAS-MX HDL Gel

Gels should be stored at 15...30°C and are stable until the expiry date indicated on the package. DO NOT REFRIGERATE OR FREEZE. Deterioration of the gel may be indicated by 1) crystalline appearance indicating the gel has been frozen, 2) cracking and peeling indicating drying of the gel or 3) visible contamination of the agarose from bacterial or fungal sources.

### 2. SAS-MX HDL Buffer

Buffer concentrate should be stored at 15...30°C until the expiry date indicated on the label. Diluted buffer is stable for 2 months at 15...30°C.

### 3. SAS-MX HDL Reagent

The reagent vials should be stored at 2...6°C and are stable until the expiry date indicated on the label. Reconstituted reagent is stable for 72 hours at 2...6°C.

### 4. SAS-MX HDL Diluent

The diluent should be stored at 2...6°C and is stable until the expiry date indicated on the label.

## ITEMS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Cat. No. 4063 SAS-MX Chamber

Cat. No. 1525 EPS 600 Power Supply

Cat. No. 4062 Incubation Chamber

Drying oven with forced air capable of 60...70°C.

Incubator capable of 30°C.

Glass Plate

Destain Solution: Mix 50ml glacial acetic acid and 950ml of purified water. Store in a tightly stoppered bottle.

Purified water

## SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Fresh serum or EDTA anticoagulated plasma is the specimen of choice. Samples can be stored refrigerated at 2...6°C for up to 4 days. DO NOT FREEZE.

### Patient Preparation:

- 1) If HDL Cholesterol is the only parameter to be determined, the patient need not be fasting. If other lipid values are to be determined then the patient should fast for a 12-14 hour period prior to sampling.
- 2) Discontinue all drugs for 3-4 weeks if possible.
- 3) The patient should be maintaining a stable weight and be on normal diet for at least 1 week.
- 4) Wait 4-8 weeks after a myocardial infarction or similar traumatic episode.

### Interfering Factors:

- 1) Heparin therapy can lead to alterations in the migration of the lipoproteins, particularly beta lipoprotein.

**Sample preparation:** Samples should be diluted 1 + 1 with buffer (1 part sample + 1 part buffer).

**STEP-BY-STEP PROCEDURE**

1. Remove the gel from the packaging and place on a blotter D. Blot the gel surface with a blotter C, discard blotter.
2. Align the sample application template with the arrows at the edge of the gel. Place a blotter A on top of the template and rub a finger across the slits to ensure good contact. Remove the blotter and retain for use in step 5.
3. Apply 5 $\mu$ l of sample to each slit and allow to absorb for 5 minutes.
4. Whilst the samples are absorbing, pour 35ml of buffer into each inner section of the SAS-MX Chamber. Place the plastic Heat Shield into the inner section of the chamber.
5. Following sample absorption, blot the template with the blotter A retained from step 2 and remove both blotter and template.
6. Position the gel in the chamber agarose side down, aligning the positive (+) and negative (-) sides with the corresponding positions on the chamber.
7. Electrophorese the gel: 80 volts, 35 minutes
8. Whilst the samples are electrophoresing, place the glass plate moistened with water into the incubation chamber and place in the incubator set at 30°C to equilibrate.
9. Approximately 2-4 minutes before the end of electrophoresis, reconstitute 1 vial of HDL reagent by adding 1ml of HDL diluent and mix well. Do not shake.
10. Following electrophoresis, place the gel agarose side up onto a blotter D and place into a drying oven with forced air at 60°C for 2 minutes.
11. Remove the gel from the oven and place on the pre-incubated glass plate. Pour the contents of the HDL reagent vial along the anode (+) edge of the gel.
12. Using a serological pipette, spread the reagent from the anode edge to the cathode (-) edge of the gel. Wait 30 seconds and spread the reagent back to the anode. Wait 30 seconds and roll the excess reagent off gel.
13. Remove the gel from the glass plate and place in the incubation chamber. Incubate the gel: 30 minutes, 30°C.
14. Immerse the gel in destain solution for 5 minutes with gentle agitation.
15. Dry the gel at 60...70°C.
16. Wash the gel in purified water for 5 minutes with gentle agitation.
17. Dry the gel.

**INTERPRETATION OF RESULTS**

It is recommended that any evaluation of the gels is performed against normal values which have been produced for this test in each individual laboratory.

Treatment decisions in the NCEP guidelines are based primarily on LDL Cholesterol levels<sup>7</sup>:

**Total Cholesterol**

Desirable blood cholesterol	<200 mg/dL
Borderline-High blood cholesterol	200-239 mg/dL
High blood cholesterol	>240 mg/dL

## HDL Cholesterol

Low HDL cholesterol	<35 mg/dL
Protective HDL cholesterol	>60 mg/dL

## Triglycerides

Desirable	<250 mg/dL
Borderline	250-500 mg/dL
Elevated	500-1000 mg/dL
Severely elevated/pancreatitis	> 1000 mg/dL

## LDL Cholesterol

Dietary Therapy	Initiation Level	LDL Goal
Without CHD and <2 risk factors	≥ 160 mg/dL	< 160 mg/dL
Without CHD and 2 risk factors	≥ 130 mg/dL	< 130 mg/dL
With CHD	> 100 mg/dL	≤ 100 mg/dL

## Drug Therapy

Without CHD and <2 risk factors	≥ 190 mg/dL	< 160 mg/dL
Without CHD and > 2 risk factors	≥ 160 mg/dL	< 130 mg/dL
With CHD	> 130 mg/dL	≤ 100 mg/dL

The risk factors considered in the classification scheme are Age (males ≥45 years old, females ≥55 years old), family history of premature CHD, smoking, hypertension and diabetes. HDL Cholesterol is considered high risk ≤35 mg/dL and is counted as a risk factor in the classification. HDL Cholesterol >60 mg/dL is considered protective and subtracts one from the total number of risk factors.

## QUALITY CONTROL

The Gel HDL Control (Cat. No. 3218) can be used to verify all phases of the procedure and should be used on each plate run. Refer to the package insert for acceptable assay values.

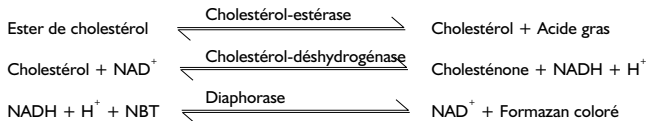
## BIBLIOGRAPHY

1. Barr, D.P. et al 'Protein-lipid Relationships in Human Plasma', Am. J. Med., 1951 ; 11 : 480-493.
2. Miller, G.J and Miller, N.E. 'Plasma-High Density-Lipoprotein Concentration and Development of Ischemic Heart Disease', Lancet, 1976 ; 1 : 16-19.
3. Kannel, W.B. et al 'Serum Cholesterol, Lipoproteins and the Risk of Coronary Heart Disease' Ann. Inter. Med., 1971 ; 74 (1) : 1-12.
4. Gordon, T. et al 'High Density Lipoprotein as a Protective Factor Against Coronary Artery Disease. The Framingham Study', Am. J. Med., 1977 ; 62 : 707-714.
5. Galen, R.S. 'HDL Cholesterol, How Good a Risk Factor?', Diag. Med., 1979 ; Nov/Dec : 39-58.
6. Castelli, W.P. et al.'HDL Cholesterol and Other Lipids in Coronary Heart Disease - The Cooperative Lipoprotein Phenotyping Study' Circulation, 1977 ; 55 (5) : 767-772.
7. National Cholesterol Education Program, Second report of the expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel II). NCEP 1993.
8. Delalla, O.F. and Gofman, J.W. 'Ultracentrifugal Analysis of Serum Lipoprotein', in Methods of Biochemical Analysis, Vol. 1, D. Glick (Ed.), New York, Interscience, 459-478, 1954.

9. Burstein, M. and Scholnick, H.R., 'Precipitation of Chylomicrons and Very Low density Lipoproteins From Human Serum With Sodium Lauryl Sulfate', *Life Sci.*, 1972; 11 : 177-184.
10. Cobb, S.A. and Sanders J.L., 'Enzymic Determination of Cholesterol in Serum Lipoproteins Separated by Electrophoresis', *Clin. Chem.*, 1978; 24(7) : 1116-1120.

## UTILISATION

Le kit SAS-MX HDL est utilisé pour la quantification et la séparation du cholestérol HDL (lipoprotéine de haute densité) des autres types de lipoprotéines du sérum ou du plasma grâce à une électrophorèse en gel d'agarose puis à une coloration enzymatique du cholestérol de chaque lipoprotéine conformément à la série de réaction suivante :



La relation entre le cholestérol HDL et les cardiopathies ischémiques a été signalée par Barr et al. en 1951<sup>1</sup> et par Miller et Miller en 1975<sup>2</sup>. Les travaux de Castelli et al.<sup>3,6</sup> se sont centrés sur la détermination du cholestérol HDL en tant qu'analyse en laboratoire servant à déterminer les risques de cardiopathies ischémiques. Le National Cholesterol Education Program (NCEP) recommande aux laboratoires d'analyse de biologie médicale de réaliser un dosage du cholestérol total, HDL et LDL ainsi que des triglycérides<sup>7</sup>.

Le dosage du cholestérol des fractions lipoprotéiques est déterminé par ultracentrifugation<sup>8</sup>, par précipitation sélective<sup>9</sup> et par électrophorèse sur divers milieux<sup>10</sup>.

## PRÉCAUTIONS

Tous les réactifs sont à usage diagnostic in-vitro uniquement. Ne pas ingérer ou pipeter à la bouche aucun composant. Se reporter aux fiches de sécurité des composants du kit pour la manipulation et l'élimination.

## COMPOSITION

### 1. Plaque SAS-MX HDL (x10)

Contient de l'agarose dans un tampon Tris / Barbital additionné d'azide de sodium comme conservateur. Le gel est prêt à l'emploi.

### 2. Tampon SAS-MX HDL (1x 100ml)

Contient un tampon Tris / Barbital / Barbital sodique avec de l'azide de sodium comme conservateur. Diluer le contenu du flacon dans 1 litre d'eau distillée et bien mélanger.

### 3. Réactif SAS-MX HDL (10x 1ml)

Contient les composants nécessaires pour identifier le cholestérol conformément à la série de réactions indiquée auparavant. La section MÉTHODOLOGIE fournit les instructions nécessaires à la reconstitution.

### 4. Diluant SAS-MX HDL (1x 27ml)

Contient du Triton X-100 dans un tampon HEPES, pH 6,9-7,1. Le diluant est prêt à l'emploi.

### 5. Autres composants du kit

Chaque kit contient également une fiche technique, des buvards A, C et D et des masques applicateur échantillons (Template) pour 10 gels.



**STOCKAGE ET CONSERVATION****1. Plaque SAS-MX HDL**

Les gels doivent être conservés entre 15...30°C; ils sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage. Ne pas réfrigérer ou congeler. Les conditions suivantes indiquent une détérioration du gel: 1) des cristaux visibles indiquant que le gel a été congelé, 2) des craquelures indiquant une déshydratation du gel, 3) une contamination visible, bactérienne ou fongique.

**2. Tampon SAS-MX HDL**

Le tampon concentré doit être conservé entre 15...30°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Après reconstitution, le tampon est stable 2 mois entre 15...30°C.

**3. Réactif SAS-MX HDL**

Les flacons de réactif doivent être conservés entre 2...6°C; ils sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Le réactif reconstitué est stable 72 heures entre 2...6°C.

**4. Diluant SAS-MX HDL**

Le diluant doit être conservé entre 2...6°C; il est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

**MATÉRIELS NÉCESSAIRES NON FOURNIS**

Réf. 4063 Chambre de migration SAS-MX

Réf. 1525 Générateur EPS 600

Réf. 4062 Chambre d'incubation

Étuve de séchage à convection forcée offrant une température entre 60...70°C

Incubateur offrant une température de 30°C

Plaque de verre

Solution décolorante : Mélanger 50ml d'acide acétique glacial avec 950ml d'eau distillée. Conserver en bouteille hermétiquement fermée.

Eau distillée

**PRÉLÈVEMENTS DES ÉCHANTILLONS**

L'utilisation de sérum fraîchement prélevé ou de plasma sur EDTA est fortement recommandée.

Les échantillons peuvent être conservés 4 jours entre 2...6°C. Ne pas les congeler.

**Préparation du patient:**

- 1) Si le cholestérol HDL est le seul paramètre à déterminer, il n'est pas nécessaire que le patient soit à jeun. Si vous devez déterminer le taux d'autres lipides, le patient doit être à jeun 12-14 heures avant le prélèvement de l'échantillon.
- 2) Arrêter, si possible, la prise de médicaments 3 à 4 semaines avant le prélèvement.
- 3) Il convient que le patient ait un poids stable et suive une diète normale au moins une semaine auparavant.
- 4) Attendre au moins 4 à 8 semaines après un infarctus du myocarde ou traumatisme similaire.

**Facteurs interférents:**

- 1) Il est possible qu'une héparinothérapie altère la migration des lipoprotéines, en particulier des bêta-lipoprotéines.

**Préparation de l'échantillon:** Les échantillons doivent être dilués au 1/2 avec du tampon (1 volume d'échantillon + 1 volume de tampon).

## MÉTHODOLOGIE

1. Sortir le gel de son emballage et le déposer sur un buvard D. Sécher la surface du gel à l'aide d'un buvard C, jeter le buvard.
2. Disposer le masque applicateur échantillon en faisant correspondre les flèches avec les 2 fentes latérales. Placer un buvard A sur le masque et passer délicatement le doigt sur les fentes afin d'assurer un contact optimal. Retirer le buvard A et le conserver pour l'étape 5.
3. Déposer 5µl d'échantillon traité sur chaque fente et laisser absorber 5 minutes.
4. Pendant ce temps, verser 35ml de tampon dans chaque compartiment intérieur de la chambre de migration SAS-MX. Placer l'écran thermique en plastique dans le compartiment intérieur de la chambre.
5. Une fois l'absorption de l'échantillon terminée, sécher le masque applicateur avec le buvard A conservé à l'étape 2 puis enlever le buvard et le masque applicateur.
6. Placer le gel, agarose vers le bas, dans la chambre de migration, en respectant les polarités.
7. Faire migrer à 80 volts pendant 35 minutes.
8. Pendant que la migration a lieu, placer la plaque de verre humidifiée avec de l'eau dans la chambre d'incubation et la régler à 30°C pour qu'elle s'équilibre.
9. Environ 2-4 minutes avant la fin de l'électrophorèse, reconstituer 1 flacon de réactif HDL en ajoutant 1ml de diluant HDL et bien mélanger. Ne pas agiter.
10. Une fois l'électrophorèse terminée, placer le gel, agarose vers le haut, sur un buvard D et les mettre pendant 2 minutes dans une étuve ventilée à 60°C.
11. Enlever le gel de l'étuve et le placer sur la plaque de verre pré-incubée. Verser le contenu du flacon de réactif HDL du côté anodique (+) du gel.
12. À l'aide d'une pipette sérologique, étaler le réactif depuis le côté anodique jusqu'au côté cathodique (-) du gel. Attendre 30 secondes puis étaler à nouveau le réactif vers l'anode. Attendre 30 secondes puis enlever le réactif en excès.
13. Retirer le gel de la plaque de verre et le placer dans la chambre d'incubation. Incuber le gel pendant 30 minutes à 30°C.
14. Plonger le gel dans la solution décolorante pendant 5 minutes en agitant doucement.
15. Sécher le gel entre 60...70°C.
16. Rincer le gel dans de l'eau distillée pendant 5 minutes en agitant doucement.
17. Sécher le gel.

## INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Il est recommandé de réaliser chaque évaluation en comparant les gels à un modèle normal obtenu dans les mêmes conditions pour chaque laboratoire.

Les décisions concernant le traitement à mettre en œuvre dans les directrices du NCEP se basent principalement sur le taux de cholestérol LDL<sup>7</sup> :

### **Cholestérol total**

Cholestérolémie normale	< 200 mg/dl
Cholestérolémie limite	200-239 mg/dl
Cholestérolémie élevée	> 240 mg/dl

**Cholestérol HDL**

Cholestérol HDL faible	< 35 mg/dl
Cholestérol HDL protecteur	> 60 mg/dl

**Triglycérides**

Normal	< 250 mg/dl
Limite	250-500 mg/dl
Élevé	500-1000 mg/dl
Extrêmement élevé / pancréatite	> 1000 mg/dl

**Cholestérol LDL**

<b>Thérapie alimentaire</b>	<b>Taux initial</b>	<b>LDL cible</b>
Sans cardiopathie et < 2 facteurs de risque	> 160 mg/dl	< 160 mg/dl
Sans cardiopathie et > 2 facteurs de risque	> 130 mg/dl	< 130 mg/dl
Avec cardiopathie	> 100 mg/dl	< 100 mg/dl

**Pharmacothérapie**

Sans cardiopathie et < 2 facteurs de risque	> 190 mg/dl	< 160 mg/dl
Sans cardiopathie et > 2 facteurs de risque	> 160 mg/dl	< 130 mg/dl
Avec cardiopathie	> 130 mg/dl	< 100 mg/dl

Les facteurs de risque pris en compte dans la classification sont: l'âge (hommes: >45 ans; femmes: >55 ans), les antécédents familiaux de cardiopathies ischémiques, le tabagisme, l'hypertension et le diabète. Si le taux de cholestérol HDL est <35mg/dl (risque élevé), il constitue alors un facteur de risque supplémentaire dans la classification. Au contraire, si le taux de cholestérol HDL est >60 mg/dl (protecteur), vous devez diminuer d'un le nombre de facteurs de risque.

**CONTRÔLE QUALITÉ**

Le contrôle HDL (Réf. 3218) peut être utilisé afin de vérifier toutes les phases de la technique et doit être déposé sur chaque plaque. La notice indique les valeurs appropriées du dosage.

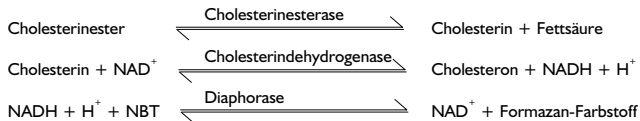
**BIBLIOGRAPHIE**

1. Barr, D.P. et al. 'Protein-lipid Relationships in Human Plasma', Am. J. Med., 1951 ; 11 : 480-493.
2. Miller, G. J. et Miller, N. E. 'Plasma-High Density-Lipoprotein Concentration and Development of Ischemic Heart Disease', Lancet, 1976 ; 1 : 16-19.
3. Kannel, W.B. et al 'Serum Cholesterol, Lipoproteins and the Risk of Coronary Heart Disease' Ann. Inter. Med., 1971 ; 74 (1) : 1-12.
4. Gordon, T. et al. 'High Density Lipoprotein as a Protective Factor Against Coronary Artery Disease. The Framingham Study', Am. J. Med., 1977 ; 62 : 707-714.
5. Galen, R.S. 'HDL Cholesterol, How Good a Risk Factor?', Diag. Med., 1979 ; nov/déc : 39-58.
6. Castelli, W. P. et al. 'HDL Cholesterol and Other Lipids in Coronary Heart Disease - The Cooperative Lipoprotein Phenotyping Study', Circulation, 1977 ; 55 (5) : 767-772.
7. National Cholesterol Education Program, Second report of the expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel II). NCEP 1993.
8. Delalla, O. F. et Gofman, J. W. 'Ultracentrifugal Analysis of Serum Lipoprotein', in Methods of Biochemical Analysis, Vol. 1, D. Glick (éd.), New York, Interscience, 459-478, 1954.

9. Burstein, M. et Scholnick, H. R., 'Precipitation of Chylomicrons and Very Low density Lipoproteins From Human Serum With Sodium Lauryl Sulfate', *Life Sci.*, 1972 ; 11 : 177-184.
10. Cobb, S. A. et Sanders J. L., 'Enzymic Determination of Cholesterol in Serum Lipoproteins Separated by Electrophoresis', *Clin. Chem.*, 1978; 24(7) : 1116-1120.

**ANWENDUNGSBEREICH**

The SAS-MX HDL Kit dient der Auftrennung von High-Density-Lipoprotein- (HDL) -Cholesterin von anderen Lipoproteinklassen und seiner Quantifizierung im Serum oder Plasma durch Agarose-Gel-Elektrophorese und enzymatischer Färbung der Cholesterinkomponenten der einzelnen Lipoproteine gemäß des folgenden Reaktionsablaufs:



Über die Verbindung von HDL-Cholesterin zur koronaren Herzerkrankung (KHK) wurde 1951 von Barr et al.<sup>1</sup> und 1975 von Miller und Miller<sup>2</sup> berichtet. Die Arbeiten von Castelli et al.<sup>3,4</sup> hoben den HDL-Cholesterin-Befund als den endgültigen Labortest zum Erkennen eines KHK Risikos hervor. Klinische Empfehlungen des Ausschuss für das „National Cholesterol Education Program (NCEP)“ weisen klinische Labors an, sowohl das Gesamt-, HDL- und LDL- Cholesterin sowie auch die Triglyzeride zu untersuchen.<sup>7</sup>

Der Cholesteringehalt der Lipoproteinfraktionen ist durch Ultrazentrifugation<sup>8</sup>, selektive Präzipitation<sup>9</sup> und Elektrophorese auf verschiedenen Trägermedien<sup>10</sup> bestimmt worden.

**WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN**

Alle Reagenzien sind nur zur in-vitro-Diagnostik bestimmt. Nicht einnehmen oder mit dem Mund pipettieren. Bitte lesen Sie das Sicherheitsdatenblatt mit den Gefahrenhinweisen und Sicherheitsvorschlägen sowie die Informationen zur Entsorgung.

**INHALT**

- SAS-MX HDL-Gel (x10)**  
Enthält Agarose in einem Tris-Barbital-Puffer mit Natriumazid als Konservierungsmittel. Das Gel ist gebrauchsfertig verpackt.
- SAS-MX HDL-Puffer (1x 100ml)**  
Enthält Tris-, Barbital- und Natriumbarbital-Puffer mit Natriumazid als Konservierungsmittel. Den Inhalt der Flasche mit dest. Wasser auf 1 Liter verdünnen. Gut schütteln.
- SAS-MX HDL-Reagenz (10x 1ml)**  
Enthält die wie im obigen Reaktionsablauf gezeigten und zur Identifikation von Cholesterin benötigten Bestandteile. Siehe SCHRITT-FÜR-SCHRITT METHODE für die Rekonstitutionsanleitung.
- SAS-MX HDL-Verdünnungspuffer (1x 27ml)**  
Enthält Triton X-100 in HEPES-Puffer, pH 6.9-7.1. Der Verdünnungspuffer ist gebrauchsfertig verpackt.
- Weitere Kit-Komponenten**  
Jedes Kit enthält eine Methodenbeschreibung sowie die zur Durchführung der Elektrophorese notwendigen Auftragschablonen, Blotter A, C und D für 10 Gele.

## **LAGERUNG UND STABILITÄT**

### **1. SAS-MX HDL-Gel**

Gele sollten bei 15...30°C gelagert werden und sind bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Nicht im Kühlschrank oder Tiefkühlschrank aufbewahren! Der Zustand des Gels kann sich verschlechtern. Dafür gibt es folgende Merkmale: 1) Kristallisation weist auf vorangegangenes Einfrieren hin, 2) Risse und Ablösen weisen auf ein Austrocknen des Gels hin, und 3) sichtbare Kontamination der Agarose durch Bakterien oder Pilze.

### **2. SAS-MX HDL-Puffer**

Pufferkonzentrat sollte bis zum aufgedruckten Verfallsdatum bei 15...30°C gelagert werden. Verdünnter Puffer ist bei 15...30°C für 2 Monate stabil.

### **3. SAS-MX HDL-Reagenz**

Die Reagenzfläschchen sollten bei 2...6°C gelagert werden und sind bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Rekonstituiertes Reagenz ist bei einer Temperatur von 2...6°C für 72 Stunden stabil.

### **4. SAS-MX HDL-Verdünnungspuffer**

Der Verdünnungspuffer sollte bei 2...6°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil.

## **NICHT MITGELIEFERTES, ABER BENÖTIGTES MATERIAL**

Kat. Nr. 4063 SAS-MX Kammer

Kat. Nr. 1525 EPS 600 Netzteil

Kat. Nr. 4062 Inkubationskammer

Trockenschrank mit Umluft und einer Temperaturleistung von 60...70°C.

Inkubator mit einer Temperaturleistung von 30°C.

Glasplatte

Entfärbelösung: 50ml Eisessig mit 950ml dest. Wasser mischen. In einer fest verschlossenen Flasche aufbewahren.

Dest. Wasser

## **PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG**

Frisches Serum oder EDTA-Plasma ist das Untersuchungsmaterial der Wahl. Proben können im Kühlschrank bei 2...6°C bis zu 4 Tagen gelagert werden. Nicht einfrieren.

### **Patientenvorbereitung:**

- 1) Ist das HDL-Cholesterin der einzige zu bestimmende Parameter muss der Patient nicht nüchtern sein. Sollen noch andere Lipidwerte bestimmt werden, sollte der Patient vor der Blutentnahme 12 -14 Stunden nichts zu sich genommen haben.
- 2) Falls möglich alle Medikamente 3-4 Wochen lang absetzen.
- 3) Der Patient sollte sein Gewicht halten und mindestens für 1 Woche ganz normal essen.
- 4) Nach einem Myokardinfarkt oder ähnlichen traumatischen Ereignis 4-8 Wochen warten.

### **Störfaktoren:**

- 1) Heparintherapie kann die Wanderung der Lipoproteine, ganz besonders der Beta-Lipoproteine, verändern.

**Probenvorbereitung:** Proben müssen 1+1 mit Puffer (1 Teil Probe + 1 Teil Puffer) verdünnt werden.

**SCHRITT-FÜR-SCHRITT METHODE**

1. Gel aus der Schutzhülle nehmen und auf einen Blotter D legen. Die Geloberfläche mit einem Blotter C blotten und den Blotter werfen.
2. Die Auftragschablone so auf das Gel legen, dass die Pfeile am Rand des Gels liegen. Blotter A auf die Schablone legen und mit einem Finger über die Schlitze der Schablone streichen, um eine gute Haftung zu gewährleisten. Blotter A entfernen und ihn bis zur Verwendung in Schritt 5 beiseite legen.
3. 5µl der Probe in jeden Schablonenschlitz pipettieren. Die Probe 5 Minuten ins Gel diffundieren lassen.
4. Während die Probe einwirkt, 35ml Puffer in jeden der inneren Bereiche der SAS-MX-Kammer füllen. Den Hitzeschutz aus Plastik in den inneren Teil der Kammer legen.
5. Nach Absorption der Probe den Blotter A aus Schritt 2 auf die Schablone drücken. Anschließend Schablone und Blotter entfernen.
6. Das Gel in die Kammer spannen, Agarose nach unten, und auf übereinstimmende Polarisierung achten (Pluszeichen auf dem Gel und Pluszeichen in der Kammer).
7. Gel-Elektrophorese durchführen: 80 Volt, 35 Minuten
8. Während die Elektrophorese läuft, die mit Wasser angefeuchtete Glasplatte in die Inkubationskammer legen und zum Anwärmen in den 30°C warmen Inkubator legen.
9. Ungefähr 2-4 Minuten vor Elektrophorese-Ende 1 Fläschchen HDL-Reagenz durch Zugabe von 1 ml HDL-Verdünnungspuffer rekonstituieren und gut mischen. Nicht schütteln.
10. Nach der Elektrophorese das Gel mit der Agaroseseite nach oben auf einen Blotter D legen und bei 60°C für 2 Minuten in den Umluft-Trockenschrank geben.
11. Das Gel aus dem Trockenschrank nehmen und auf die vorgewärmte Glasplatte legen. Den Inhalt des Fläschchens mit HDL-Reagenz entlang der Anodenseite (+) des Gels gießen.
12. Mit einer Pasteurpipette das Reagenz von der Anodenseite zur Kathodenseite (-) des Gels verteilen. 30 Sekunden warten und das Reagenz zurück auf die Anodenseite verteilen. 30 Sekunden warten und überschüssiges Reagenz von Gel abrollen.
13. Das Gel von der Glasplatte entfernen und in die Inkubationskammer geben. Gel inkubieren: 30 Minuten, 30°C.
14. Das Gel unter leichtem Schwenken 5 Minuten in Entfärbelösung tauchen.
15. Das Gel bei 60 bis 70°C trocknen.
16. Das Gel unter leichtem Schwenken für 5 Minuten in dest. Wasser waschen.
17. Gel trocknen.

**AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE**

Es wird empfohlen, die Auswertung der Gele gegen Normalwerte vorzunehmen, die für diesen Test in jedem einzelnen Labor ermittelt worden sind.

Der Behandlungssindikation nach NCEP-Leitlinien beruhen in erster Linie auf die LDL-Cholesterinwerte :

**Gesamtcholesterin**

Normalwert Cholesterin im Blut	< 200 mg/dL
Hohes Cholesterin im Blut - Grenzwert	200-239 mg/dL
Hohes Cholesterin im Blut	< 240 mg/dL

## HDL-Cholesterin

Niedriges HDL-Cholesterin	< 35 mg/dL
Schützendes HDL-Cholesterin	> 60 mg/dL

## Triglyzeride

Normalwert	< 250 mg/dL
Grenzwert	250-500 mg/dL
Erhöht	500-1000 mg/dL
Stark erhöht/Pankreatitis	> 1000 mg/dL

## LDL-Cholesterin

<b>Diättherapie</b>	<b>Ausgangswert</b>	<b>LDL-Zielwert</b>
Ohne KHK und <2 Risikofaktoren	> 160 mg/dL	< 160 mg/dL
Ohne KHK und <2 Risikofaktoren	> 130 mg/dL	< 130 mg/dL
Mit KHK	> 100 mg/dL	< 100 mg/dL

## Medikamententherapie

Ohne KHK und <2 Risikofaktoren	> 190 mg/dL	< 160 mg/dL
Ohne KHK und >2 Risikofaktoren	> 160 mg/dL	< 130 mg/dL
Mit KHK	> 130 mg/dL	< 100 mg/dL

Die Risikofaktoren im obigen Klassifikationsschema sind Alter (Männer >45 Jahren, Frauen >55 Jahren), frühzeitige KHK in der Familienanamnese, Rauchen, Bluthochdruck und Diabetes. HDL-Cholesterin gilt als hohes Risiko <35mg/dL und wird bei der Klassifikation als Risikofaktor mit einbezogen. Ein HDL-Cholesterin >60mg/dL wird als schützend gewertet und verringert die Gesamtzahl der Risikofaktoren um die Zahl 1.

## QUALITÄTSKONTROLLE

Die Gel-HDL-Kontrolle (Kat. Nr. 3218) überprüft alle Phasen der Methode und sollte bei jedem Lauf mitgeführt werden. Bitte entnehmen Sie die zulässigen Assay-Werte der Packungsbeilage.

## LITERATUR

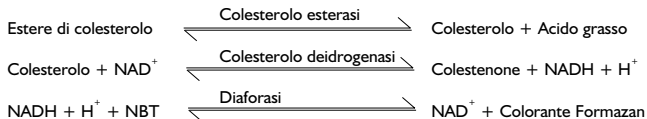
1. Barr, D.P. et al 'Protein-lipid Relationships in Human Plasma', Am. J. Med., 1951 ; 11 : 480-493.
2. Miller, G.J and Miller, N.E. 'Plasma-High Density-Lipoprotein Concentration and Development of Ischemic Heart Disease', Lancet, 1976 ; 1 : 16-19.
3. Kannel, W.B. et al 'Serum Cholesterol, Lipoproteins and the Risk of Coronary Heart Disease' Ann. Inter. Med., 1971 ; 74 (1) : 1-12.
4. Gordon, T. et al 'High Density Lipoprotein as a Protective Factor Against Coronary Artery Disease. The Framingham Study', Am. J. Med., 1977 ; 62 : 707-714.
5. Galen, R.S. 'HDL Cholesterol, How Good a Risk Factor?', Diag. Med., 1979 ; Nov/Dec : 39-58.
6. Castelli, W.P. et al.'HDL Cholesterol and Other Lipids in Coronary Heart Disease - The Cooperative Lipoprotein Phenotyping Study' Circulation, 1977; 55 (5): 767-772.
7. National Cholesterol Education Program, Second report of the expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel II). NCEP 1993.
8. Delalla, O.F. and Gofman, J.W. 'Ultracentrifugal Analysis of Serum Lipoprotein', in Methods of Biochemical Analysis, Vol. 1, D. Glick (Ed.), New York, Interscience, 459-478, 1954.



9. Burstein, M. and Scholnick, H.R., 'Precipitation of Chylomicrons and Very Low density Lipoproteins From Human Serum With Sodium Lauryl Sulfate', *Life Sci.*, 1972; 11 : 177-184.
10. Cobb, S.A. and Sanders J.L., 'Enzymic Determination of Cholesterol in Serum Lipoproteins Separated by Electrophoresis', *Clin. Chem.*, 1978; 24(7) : 1116-1120.

## PRINCIPIO

Il kit SAS-MX HDL viene utilizzato per la separazione e la quantificazione del colesterolo legato alle lipoproteine ad alta densità (HDL) dalle altre classi di lipoproteine nel siero o nel plasma, mediante elettroforesi su gel di agarosio e colorazione enzimatica della componente colesterolica di ciascuna lipoproteina, in base alla sequenza di reazioni riportata di seguito:



La relazione tra il colesterolo HDL e le coronaropatie (CHD) è stata riferita da Barr et al. nel 1951<sup>1</sup> e da Miller e Miller nel 1975<sup>2</sup>. Il lavoro di Castelli et al.<sup>3,6</sup> si è concentrato sulla valutazione del colesterolo HDL come test di laboratorio definitivo nella determinazione del rischio di CHD. Le raccomandazioni cliniche dei medici aderenti al National Cholesterol Education Program (NCEP) diedero istruzioni ai laboratori clinici di eseguire misure del colesterolo totale, HDL e LDL e dei trigliceridi<sup>7</sup>.

Il tenore di colesterolo nelle frazioni lipoproteiche è stato determinato mediante ultracentrifugazione, precipitazione selettiva<sup>9</sup> ed elettroforesi su vari mezzi<sup>10</sup>.

## AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Tutti i reagenti devono essere utilizzati esclusivamente per diagnosi in vitro. Non ingerire né pipettare con la bocca i componenti del kit. Fare riferimento alle istruzioni del prodotto per avvertenze su rischi e sicurezza dei componenti e informazioni per lo smaltimento.

## COMPOSIZIONE

### 1. SAS-MX Gel per HDL (x10)

Contiene agarosio in tampone tris / barbital con sodio azide come conservante. Il gel è pronto all'uso nella confezione fornita.

### 2. SAS-MX Tampone per HDL (1x 100ml)

Contiene tampone tris, barbital e sodio barbital con sodio azide come conservante. Diluire l'intero contenuto del flacone con 1 litro di acqua distillata e miscelare bene.

### 3. SAS-MX Reagente per HDL (10x 1ml)

Contiene i reagenti necessari all'identificazione del colesterolo secondo la sequenza di reazioni sopra illustrata. Ved. il paragrafo PROCEDURA per le istruzioni di ricostituzione.

### 4. SAS-MX Diluente per HDL (1x 27ml)

Contiene Triton X-100 in tampone HEPES, pH 6.9-7.1. Il diluente è pronto all'uso così come viene fornito.

### 5. Altri componenti del kit

Ogni kit contiene un foglio procedurale, blotter A, C, D e mascherine per l'applicazione dei campioni in quantità sufficiente per completare 10 gel.

## **CONSERVAZIONE E STABILITÀ**

### **1. SAS-MX Gel per HDL**

I gel devono essere conservati a 15...30°C e sono stabili fino alla data di scadenza riportata sulla confezione. Non refrigerare né congelare. Il deterioramento del gel può essere indicato da 1) formazioni cristalline per effetto di congelamento, 2) screpolature e fessurazione per effetto di essiccamento oppure, 3) contaminazione visibile dell'agarosio causata da batteri o funghi.

### **2. SAS-MX Tampone per HDL**

Il tampone concentrato deve essere conservato a 15...30°C ed è stabile fino a data di scadenza riportata sull'etichetta. Il tampone diluito è stabile per 2 mesi a 15...30°C.

### **3. SAS-MX Reagente per HDL**

I flaconi di reagente devono essere conservati a 2...6°C e sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Il reagente ricostituito è stabile per 72 ore a 2...6°C.

### **4. SAS-MX Diluente per HDL**

Il diluente deve essere conservato a 2...6°C ed è stabile fino a data di scadenza riportata sull'etichetta.

## **MATERIALI NECESSARI, MA NON IN DOTAZIONE**

Cod. N. 4063 Camera SAS-MX

Cod. N. 1525 Alimentatore EPS 600

Cod. N. 4062 Camera d'incubazione

Forno di essiccazione ad aria forzata con temperature di 60...70°C

Incubatrice prevista per 30°C.

Piastra in vetro

Soluzione decolorante: Mescolare 50ml di acido acetico glaciale e 950ml di acqua distillata.

Conservare in una bottiglia tappata ermeticamente.

Acqua distillata

## **RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE**

Il campione ideale è costituito da siero fresco o plasma trattato con EDTA. I campioni possono essere refrigerati a 2...6°C fino a 4 giorni. Non congelare.

### **Preparazione del paziente:**

- 1) Se l'unico parametro da stabilire è quello del colesterolo HDL, non è necessario che il paziente sia a digiuno. Qualora si debbano determinare altri valori lipidici, allora è necessario che il paziente rimanga a digiuno per un periodo di 12 -14 ore prima del prelievo.
- 2) Se possibile, sospendere tutti i farmaci per 3-4 settimane.
- 3) Il paziente deve mantenere un peso stabile ed assumere una dieta normale per almeno una settimana.
- 4) In caso di infarto miocardico o episodio traumatico simile, attendere 4-8 settimane.

### **Fattori d'interferenza:**

- 1) La terapia eparinica può causare alterazioni nella migrazione delle lipoproteine, specialmente nel caso della lipoproteina beta.

**Preparazione dei campioni:** I campioni devono essere diluiti nella misura di 1 + 1 con il tampone (1 parte di campione + 1 parte di tampone).

## PROCEDURA

1. Rimuovere il gel dalla confezione e collocarlo su un blotter D. Far assorbire la superficie del gel con un blotter C. Eliminare il blotter C.
2. Align the sample application template with the arrows at the edge of the gel. Porre un blotter A sopra alla mascherina ed effettuare una leggera pressione con le dita sulle fessure per verificare il corretto contatto. Rimuovere il blotter e conservarlo per il passaggio 5.
3. Applicare 5 $\mu$ l di campione in ogni fessura di semina e lasciare assorbire per 5 minuti.
4. Durante l'assorbimento dei campioni, collocare 35ml di tampone in ogni compartimento interno della camera SAS-MX. Collocare lo schermo termico in materiale plastico nel compartimento interno della camera.
5. Dopo l'assorbimento del campione, asciugare leggermente la mascherina con il blotter A, conservato dal passaggio 2, quindi eliminare mascherina e blotter.
6. Collocare il gel nella camera, con il lato dell'agarosio rivolto verso il basso, allineando i lati positivo (+) e negativo (-) con le corrispondenti posizioni nella camera.
7. Sottoporre il gel ad elettroforesi: 80 Volt per 35 minuti.
8. Mentre i campioni vengono sottoposti ad elettroforesi, collocare la piastra in vetro inumidita con acqua nella camera d'incubazione e sistemare l'incubatrice regolata a 30°C in modo tale da consentirne il bilanciamento.
9. Circa 2-4 minuti prima della conclusione dell'elettroforesi, ricostituire un flacone di reagente HDL aggiungendo 1 ml di diluente per HDL e mescolando bene. Non scuotere.
10. Al termine dell'elettroforesi, collocare il gel con il lato dell'agarosio verso l'alto su un blotter D ed introdurlo in un forno di essiccazione ad aria forzata a 60°C per 2 minuti.
11. Rimuovere il gel dal forno e posarlo sulla piastra in vetro preincubata. Versare il contenuto del flacone di reagente per HDL lungo il bordo anodico (+) del gel.
12. Utilizzando una pipetta sierologica, spargere il reagente dal bordo anodico al bordo catodico (-) del gel. Attendere 30 secondi e riportare il reagente verso l'anodo. Attendere ancora 30 secondi e rimuovere dal gel il reagente in eccesso.
13. Rimuovere il gel dalla piastra in vetro e collocarlo nella camera d'incubazione. Incubare il gel: 30 minuti a 30°C.
14. Immergere il gel nella soluzione decolorante per 5 minuti agitando delicatamente.
15. Asciugare il gel a 60...70°C.
16. Sciacquare il gel in acqua distillata per 5 minuti agitando delicatamente.
17. Asciugare il gel.

## INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Si raccomanda di effettuare qualsiasi valutazione dei gel sulla base dei valori normali prodotti per questo esame in ogni singolo laboratorio.

Le decisioni di trattamento contenute nelle linee guida NCEP si basano principalmente sui livelli di colesterolo LDL<sup>7</sup>:

### Colesterolo totale

Colesterolo ematico consigliato	<200 mg/dL
Colesterolo ematico limite-alto	200-239 mg/dL
Colesterolo ematico alto	>240 mg/dL

**Colesterolo HDL**

Colesterolo HDL basso	<35 mg/dL
Colesterolo HDL protettivo	>60 mg/dL

**Trigliceridi**

Consigliati	<250 mg/dL
Limite	250-500 mg/dL
Elevati	500-1000 mg/dL
Molto elevati/pancreatite	>1000 mg/dL

**Colesterolo LDL**

<b>Terapia alimentare</b>	<b>Livello di inizio</b>	<b>Obiettivo LDL</b>
Senza CHD e <2 fattori di rischio	>160 mg/dL	<160 mg/dL
Senza CHD e < 2 fattori di rischio	>130 mg/dL	<130 mg/dL
Con CHD	>100 mg/dL	<100 mg/dL

**Terapia farmacologica**

Senza CHD e < 2 fattori di rischio	>190 mg/dL	<160 mg/dL
Senza CHD e > 2 fattori di rischio	>160 mg/dL	<130 mg/dL
Con CHD	>130 mg/dL	<100 mg/dL

I fattori di rischio considerati nello schema di classificazione sono l'età (uomini >45 anni, donne >55 anni), l'anamnesi familiare di CHD precoci, il fumo, l'ipertensione e il diabete. Il colesterolo HDL viene considerato un rischio elevato se <35 mg/dL e viene ritenuto un fattore di rischio nella classificazione. Il colesterolo HDL >60 mg/dL viene considerato protettivo e sottrae un punto da numero totale di fattori di rischio.

**CONTROLLO QUALITÀ**

Il gel di controllo HDL (Cod. N. 3218) può essere utilizzato per verificare tutte le fasi della procedura e deve essere impiegato su ogni piastra. Fare riferimento alle schede all'interno della confezione per i valori di dosaggio accettabili.

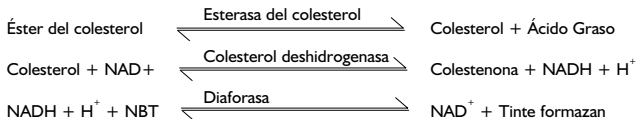
**BIBLIOGRAFIA**

1. Barr, D.P. et al 'Protein-lipid Relationships in Human Plasma', Am. J. Med., 1951 ; 11 : 480-493.
2. Miller, G.J and Miller, N.E. 'Plasma-High Density-Lipoprotein Concentration and Development of Ischemic Heart Disease', Lancet, 1976 ; 1 : 16-19.
3. Kannel, W.B. et al 'Serum Cholesterol, Lipoproteins and the Risk of Coronary Heart Disease' Ann. Inter. Med., 1971 ; 74 (1) : 1-12.
4. Gordon, T. et al 'High Density Lipoprotein as a Protective Factor Against Coronary Artery Disease. The Framingham Study', Am. J. Med., 1977 ; 62 : 707-714.
5. Galen, R.S. 'HDL Cholesterol, How Good a Risk Factor?', Diag. Med., 1979 ; Nov/Dec : 39-58.
6. Castelli, W.P. et al 'HDL Cholesterol and Other Lipids in Coronary Heart Disease - The Cooperative Lipoprotein Phenotyping Study' Circulation, 1977 ; 55 (5) : 767-772.
7. National Cholesterol Education Program, Second report of the expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel II). NCEP 1993.

8. Delalla, O.F. and Gofman, J.W. 'Ultracentrifugal Analysis of Serum Lipoprotein', in *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. 1, D. Glick (Ed.), New York, Interscience, 459-478, 1954.
9. Burstein, M. and Scholnick, H.R., 'Precipitation of Chylomicrons and Very Low density Lipoproteins From Human Serum With Sodium Lauryl Sulfate', *Life Sci.*, 1972; 11 : 177-184.
10. Cobb, S.A. and Sanders J.L., 'Enzymic Determination of Cholesterol in Serum Lipoproteins Separated by Electrophoresis', *Clin. Chem.*, 1978; 24(7) : 1116-1120.

**USO PREVISTO**

El objetivo del Kit HDL SAS-MX es la separación y cuantificación del colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) de otras clases de lipoproteínas en el suero y el plasma mediante electroforesis con gel de agarosa y la coloración enzimática del componente de colesterol de cada lipoproteína de acuerdo con la siguiente secuencia de reacción:



La relación del Colesterol HDL con la cardiopatía coronaria (CC) fue constatada por Barr et al en 1951<sup>1</sup> y por Miller and Miller en 1975<sup>2</sup>. La obra de Castelli y cols.<sup>3-6</sup> se centró en demostrar que la valoración del Colesterol HDL es la prueba de laboratorio definitiva para determinar el riesgo de CC. Las recomendaciones clínicas del Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol (NCEP) sugieren que los laboratorios clínicos midan los niveles de colesterol totales, HDL y LDL y los triglicéridos.

El contenido de colesterol en las fracciones de lipoproteína ha sido determinado mediante ultracentrifugado<sup>8</sup>, precipitación selectiva<sup>9</sup> y electroforesis sobre varios medios<sup>10</sup>.

**ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES**

Todos los reactivos están destinados únicamente para diagnóstico in-vitro. No ingerir ni chupar con la boca ningún componente del kit. Consultar la hoja con los datos de seguridad del producto acerca de los riesgos de los componentes, avisos de seguridad e información para su eliminación.

**COMPOSICIÓN****1. Gel HDL SAS-MX (x10)**

Contiene agarosa en un tampón de de Tris / Barbitol con azida de sodio como conservante. El gel viene envasado listo para usar.

**2. Concentrado tampón HDL SAS-MX (1x 100ml)**

Contiene concentrado tampón de Tris / barbitol y barbitol sódico con azida de sodio como conservante. Disolver el contenido del frasco en 1 litro de agua destilada y mezclar bien.

**3. Reactivo de HDL SAS-MX (10x 1ml)**

Contiene los compuestos necesarios para identificar el colesterol de acuerdo con la secuencia de reacción que ya hemos mostrado anteriormente. Véanse las instrucciones de reconstitución en el PROCEDIMIENTO PASO A PASO.

**4. Diluyente de HDL SAS-MX (1x 27ml)**

Contiene Triton X-100 en concentrado tampón HEPES, pH 6,9-7,1. El diluyente viene envasado listo para usar.

**5. Otros componentes del kit**

Cada kit contiene una hoja de instrucciones y suficientes plantillas de aplicación de la muestra y secantes A, C y D, hasta completar 10 geles.

## **ALMACENAMIENTO Y PERÍODO DE VALIDEZ**

### **1. Gel HDL SAS-MX**

Los geles han de almacenarse a 15...30°C y permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en el envase. No refrigerar ni congelar. El deterioro del gel puede ser indicado por: 1) apariencia cristalina, indicativo de que el gel ha sido congelado, 2) agrietamiento y descamación, indicativo del resecamiento del gel, o 3) contaminación visible de la agarosa por fuentes bacterianas o micóticas.

### **2. Tampón HDL SAS-MX**

El concentrado tampón debe almacenarse a 15...30°C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. El concentrado tampón diluido ha de almacenarse a 15...30°C y permanece estable durante 2 meses.

### **3. Reactivo HDL SAS-MX**

Los viales de reactivos han de almacenarse a 2...6°C y permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. El reactivo reconstituido permanece estable durante 72 horas a 2...6°C.

### **4. Diluyente HDL SAS-MX**

El diluyente ha de almacenarse a 2...6°C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en el envase.

## **ARTÍCULOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS**

Nº de catálogo 4063 Cámara SAS-MX

Nº de catálogo 1525 Fuente de alimentación EPS600

Nº de catálogo 4062 Cámara de Incubación

Horno con aire a presión capaz de alcanzar 60...70°C.

Incubador capaz de alcanzar 30°C.

Plato de vidrio

Solución decolorante: Mezclar 50ml de ácido acético cristalizado con 950ml de agua destilada. Guardar en un frasco herméticamente cerrado.

Agua destilada.

## **RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS**

Se ha de elegir como muestra suero recién recogido o plasma anticoagulado con EDTA. Las muestras se pueden conservar refrigeradas a 2...6°C hasta 4 días. No congelar.

### **Preparación del paciente:**

- 1) Si el único parámetro que hay que determinar es el Colesterol HDL, no es necesario que el paciente ayune. Si hay que determinar otros lípidos, el paciente debe ayunar de 12 a 14 horas antes de la toma de muestras.
- 2) Suspender los medicamentos durante 3-4 semanas si es posible.
- 3) El paciente debería mantener un peso estable y llevar una dieta normal durante al menos 1 semana.
- 4) Si ha padecido un infarto de miocardio o un episodio similar, esperar de 4 a 8 semanas.

### **Factores de interferencia:**

- 1) Los tratamientos con heparina pueden producir alteraciones en la migración de las lipoproteínas, particularmente en el caso de las lipoproteínas beta.



**Preparación de la muestra:** Las muestras deben diluirse 1 + 1 con concentrado tampón (1 parte de muestra + 1 parte de tampón).

### PROCEDIMIENTO PASO A PASO

1. Retirar el gel del envase y colóquelo en un secante D. Seque la superficie del gel con un secante C y deseche el secante.
2. Alinear la plantilla de aplicación de la muestra con las flechas existentes en el borde del gel. Aplicar un secante A sobre la parte superior de la plantilla y frotar con un dedo a lo largo de las rejillas para asegurar un buen contacto. Retirar el secante y conservarlo para utilizarlo luego en el paso 5.
3. Aplicar 5µl de muestra en cada ranura y dejar que absorba durante 5 minutos.
4. Mientras la muestra es absorbida, verter 35ml del tampón en cada hueco interior de la cámara SAS-MX. Colocar el Heat Shield de plástico en la sección interna de la cámara.
5. Finalizada la absorción de la muestra, secar la plantilla con el secante A que se conserva del paso 2 y retirar el secante y la plantilla.
6. Colocar el gel en la cámara con la agarosa hacia abajo, alineando los lados positivo (+) y negativo (-) con las posiciones correspondientes en la cámara.
7. Realizar la electroforesis del gel: 80 voltios, 35 minutos
8. Mientras se está realizando la electroforesis, colocar el plato de vidrio humedecido con agua en la cámara de incubación y colocarlo en el incubador a 30°C para que se equilibre.
9. Aproximadamente 2-4 minutos antes del final de la electroforesis, reconstituir un vial de reactivo de HDL añadiendo 1ml de diluyente de HDL y mezclar bien. No agitar.
10. Después de la electroforesis, colocar el gel con la agarosa hacia arriba en un secante D y colocar en un horno de secado a 60°C durante 2 minutos.
11. Retirar el gel del horno y colocarlo en el plato de vidrio preincubado. Verter los contenidos del vial de reactivo de HDL a lo largo del borde del ánodo (+) del gel.
12. Usando una pipeta serológica, extender el reactivo desde el borde del ánodo hasta el borde del cátodo (-) del gel. Esperar 30 segundos y extender el reactivo nuevamente al borde del ánodo. Esperar 30 segundos y retirar del gel el exceso .
13. Retirar el gel de la placa de vidrio y colocarlo en la cámara de incubación. Incubar el gel: 30 minutos, 30°C.
14. Sumergir el gel en la solución decolorante durante 5 minutos con agitación suave.
15. Secar el gel a 60...70°C.
16. Lavar el gel en agua destilada durante 5 minutos agitando suavemente.
17. Secar el gel.

### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Se recomienda realizar cualquier evaluación de los geles con respecto a valores normales obtenidos para este test en cada laboratorio individual.

La toma de decisiones sobre los tratamientos, que aparece en las directrices del NCEP, está basada principalmente en los niveles de Colesterol LDL :

#### **Colesterol Total**

Nivel deseable de colesterol en sangre	< 200 mg/dl
Frontera de nivel alto de colesterol en sangre	200-239 mg/dl
Nivel alto de colesterol	> 240 mg/dl

## **Colesterol HDL**

Bajo nivel de colesterol HDL	< 35 mg/dl
Colesterol HDL protector	> 60 mg/dl

## **Triglicéridos**

Deseable	< 250 mg/dl
Frontera	250-500 mg/dl
Elevado	500-1000 mg/dl
Gravemente elevado/pancreatitis	> 1000 mg/dl

## **Colesterol LDL**

<b>Terapia dietética</b>	<b>Nivel de iniciación</b>	<b>Objetivo LDL</b>
Sin CC y <2 factores de riesgo	160 mg/dl	< 160 mg/dl
Sin CC y £ 2 factores de riesgo	130 mg/dl	< 130 mg/dl
Con CC	100 mg/dl	< 100 mg/dl

## **Tratamiento farmacológico**

Sin CC y <2 factores de riesgo	190 mg/dl	< 160 mg/dl
Sin CC y >2 factores de riesgo	160 mg/dl	< 130 mg/dl
Con CC	> 130 mg/dl	< 100 mg/dl

Los factores de riesgo considerados en el esquema de clasificación son la edad (hombres >45 años, mujeres >55 años), los antecedentes familiares de CC prematura, la adicción al tabaco, la hipertensión y la diabetes. El Colesterol HDL se considera de alto riesgo cuando es <35 mg/dl y aparece en la clasificación como un factor de riesgo. El colesterol HDL se considera protector cuando es >60 mg/dl y resta uno del número total de factores de riesgo.

## **CONTROL DE CALIDAD**

El Control del Gel HDL (no de catálogo 3218) puede usarse para verificar todas las fases del procedimiento y debe usarse en cada prueba. Para obtener los valores apropiados de los ensayos, consultar el folleto adjunto en el envase.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Barr, D.P. et al. 'Protein-lipid Relationships in Human Plasma', Am. J. Med., 1951 ; 11 : 480-493.
2. Miller, G.J y Miller, N.E. 'Plasma-High Density-Lipoprotein Concentration and Development of Ischemic Heart Disease', Lancet, 1976 ; 1: 16-19.
3. Kannel, W.B. et al. 'Serum Cholesterol, Lipoproteins and the Risk of Coronary Heart Disease' Ann. Inter. Med., 1971 ; 74 (1): 1-12.
4. Gordon, T. et al. 'High Density Lipoprotein as a Protective Factor Against Coronary Artery Disease. The Framingham Study', Am. J. Med., 1977 ; 62 : 707-714.
5. Galen, R.S. 'HDL Cholesterol, How Good a Risk Factor?', Diag. Med., 1979 ; Nov/Dic: 39-58.
6. Castelli, W.P. et al. 'HDL Cholesterol and Other Lipids in Coronary Heart Disease - The Cooperative Lipoprotein Phenotyping Study' Circulation, 1977 ; 55 (5) : 767-772.
7. Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol, Segundo informe del panel de expertos sobre la detección, evaluación y tratamiento de la hipercolesterolemia en adultos (Panel de Tratamiento de Adultos II). NCEP 1993.

8. 'Ultracentrifugal Analysis of Serum Lipoprotein', in Methods of Biochemical Analysis, Vol. 1, D. Glick (Ed.), Nueva York, Interscience, 459-478, 1954.
9. Burstein, M. y Scholnick, H.R., 'Precipitation of Chylomicrons and Very Low density Lipoproteins From Human Serum With Sodium Lauryl Sulfate', Life Sci., 1972; 11 : 177-184.
10. Cobb, S.A. y Sanders J.L., 'Enzymic Determination of Cholesterol in Serum Lipoproteins Separated by Electrophoresis', Clin. Chem., 1978; 24(7) : 1116-1120.

Helena Biosciences Europe  
Queensway South  
Team Valley Trading Estate  
Gateshead  
Tyne and Wear  
NE11 0SD

Tel: +44 (0) 191 482 8440  
Fax: +44 (0) 191 482 8442  
Email: [info@helena-biosciences.com](mailto:info@helena-biosciences.com)  
[www.helena-biosciences.com](http://www.helena-biosciences.com)

HL-2-1309P 2008/01 (7)