

Verwendungszweck

LDL-C L-Type Test ist ein *in vitro*-Test zur quantitativen Bestimmung von Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin (LDL-C) in Serum und Plasma.

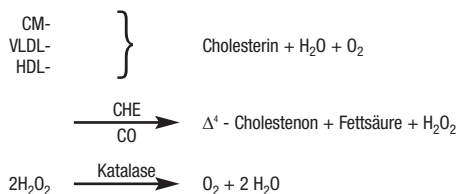
Zusammenfassung und Eigenschaften des Tests

Es ist lange bekannt, dass ein Zusammenhang zwischen dem Gesamt-Cholesterinspiegel im Blut und der koronaren Herzkrankheit (KHK) besteht. In den letzten Jahren wurde neben der Gesamtcholesterinkonzentration die Bestimmung des Low Density Lipoprotein-Cholesterins (LDL-C) zu einem wichtigen Faktor bei der individuellen Risikoabschätzung einer sich entwickelnden KHK, da ein eindeutiger positiver Zusammenhang zwischen der LDL-C-Konzentration und der KHK-Häufigkeit gefunden wurde¹. Dies führte zu einem beträchtlichen diagnostischen Interesse an der LDL-Bestimmung. Die meisten klinischen Laboratorien führen deshalb die LDL-C-Analyse routinemäßig durch. Die derzeit akzeptierte Referenzmethode wird allgemein als „Beta-Quantifizierung“^{2,3} bezeichnet. Sie beinhaltet eine Ultrazentrifugation. Da diese Methode arbeitsintensiv und verfahrensabhängig ist, ist sie in der Routine nicht sehr verbreitet. Zu Routinezwecken wird hauptsächlich die Friedewald-Formel³ verwendet. Da mit dieser Formel LDL-C aus dem Gesamt-Cholesterin, den Triglyceriden und dem HDL-C (High-Density-Lipoprotein-Cholesterin) rechnerisch bestimmt wird, ist die LDL-C-Berechnung von der Richtigkeit und Präzision dieser drei Bestimmungen abhängig. Wako LDL-C L-Type ist ein homogener Test ohne vorbereitende Schritte oder Berechnungen. Er ist zur Durchführung auf automatischen Analysengeräten geeignet.

Testprinzip

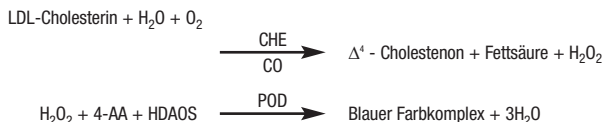
1. Reaktion (Eliminierung von nicht-LDL-Cholesterin)

Wird eine Probe mit Enzym-Farbreagenz (R1) gemischt, bindet das darin enthaltene Maskierungsreagenz an LDL und schützt es vor enzymatischen Reaktionen. Cholesterolesterase (CHE) und Cholesteroxidase (CO) reagieren mit nicht-LDL-Lipoproteinen [Chylomicronen (CM), Very Low Density Lipoprotein (VLDL) und HDL]. Das durch die enzymatische Reaktion mit nicht-LDL-Cholesterin entstehende Wasserstoffperoxid wird durch die Katalase in Enzym-Farbreagenz zersetzt.



2. Reaktion (Farbreaktion von LDL Cholesterin)

Mit Zugabe von Reaktionslösung (R2) wird das Maskierungsreagenz von LDL entfernt und die Katalase durch Natriumazid (NaN₃) inaktiviert. In diesem zweiten Schritt reagieren CHE und CO ausschließlich mit LDL-C. Das durch Enzymreaktion aus LDL-C gebildete Wasserstoffperoxid vermittelt in Gegenwart von Peroxidase (POD) eine oxidative Kupplungsreaktion zwischen N-(2-Hydroxy-3-Sulfopropyl)-3,5-Dimethoxyanilin (HDAOS) und 4-Aminoantipyrin (4-AA) und führt zu einem Farbkomplex. Die Absorption dieses blauen Farbkomplexes wird bei etwa 600 nm gemessen und die LDL-C-Konzentration der Probe im Vergleich zu dem LDL-C Calibrator berechnet.



Reagenzien

Inhalt und Lagerungsbedingungen

R1:	Enzym-Farbreagenz	bei 2–10 °C lagern
R2:	Reaktionslösung	bei 2–10 °C lagern
R2 und R2		(nicht einfrieren)
R1:	Good's-Puffer, pH 6,8	25 mmol/l
Enzym-Farbreagenz	CHE (<i>aus Pseudomonas</i>)	5.000 U/l
	CO (<i>aus Nocardia</i>)	5.000 U/l
	HDAOS	0,64 mmol/l
	Katalase (<i>aus Rinderleber</i>)	1.000.000 U/l
	Ascorbat-Oxidase (<i>aus Acremonium</i>)	5 U/ml
R2a:	Good's-Puffer, pH 7,0	25 mmol/l
Reaktionslösung	4-AA	3,4 mmol/l
	POD (<i>aus Meerrettich</i>)	20.000 U/l
	Natriumazid (NaN ₃)	0,095 %

Reagenz-Vorbereitung

- R1:** Reagenz 1 ist gebrauchsfertig. Ungeöffnet ist Reagenz 1 bei 2–10 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach Anbruch kann es bei 2–10 °C einen Monat verwendet werden.
- R2:** Reagenz 2 ist gebrauchsfertig. Ungeöffnet ist Reagenz 2 bei 2–10 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach Anbruch kann es bei 2–10 °C einen Monat verwendet werden.
- CAL:** Eine Flasche LDL-C-Calibrator mit 1 ml destilliertem oder deionisiertem Wasser rekonstituieren. Rekonstituierten LDL-C Calibrator im Kühlschrank aufbewahren, bei 2–10 °C ist er 7 Tage haltbar.

Der Kalibrator kann nach der Rekonstitution aliquotiert und einmal eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.

Probengewinnung und Vorbereitung

Serum oder Heparin-Plasma können eingesetzt werden.

Probe bis zur Analyse bei 4 °C lagern. Für längere Aufbewahrung, Proben bei -70 °C oder niedriger einfrieren⁴.

Li-Heparinatplasma werden im Mittel 3 % niedriger als Serumproben gefunden. Für EDTA-Plasma werden ca. 9 % niedrigere Werte als im Serum erwartet.

Physikalische oder chemische Hinweise auf Instabilität

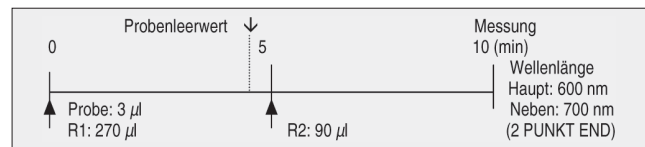
Befinden sich Ausfällungen in den Reagenzien oder liefern die Kontrollseren Werte, die außerhalb des vom Hersteller angegebenen Bereichs liegen, kann dies ein Hinweis auf Reagenzinstabilität sein.

Geräte

Die Reagenzien sind zum Einsatz auf handelsüblichen Analysenautomaten, wie z.B. dem Hitachi® 917 vorgesehen. Eine Beschreibung des Geräts und gerätespezifische Anleitungen finden Sie im entsprechenden Handbuch.

Standard-Verfahren

Temperatur: 37 °C



Das oben angegebene Testverfahren ist nur ein Beispiel. Geräteapplikationen sind auf Anfrage erhältlich.

Ergebnisse

Die Endergebnisse werden automatisch berechnet und in Konzentrationseinheiten mg/dl ausgedruckt.

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

- *In vitro* Diagnostikum.
- Nur für professioneller Anwendung.
- Nicht zur *in vivo*-Anwendung bei Menschen und Tieren.
- Reagenzien nach Ablauf des auf dem Etikett der jeweiligen Reagenzpackung angegebenen Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Die Reagenzien dürfen zu keinem anderen als dem hier beschriebenen Zweck verwendet werden.
- R2 enthält Natriumazid (0,095 %) als Stabilisator. Natriumazid kann mit Kupfer- oder Bleileitungen zu explosiven Stoffen reagieren. Auch wenn dieses Reagenz nur geringe Mengen an Natriumazid enthält, müssen die Ausgüsse bei Entsorgung der Lösung mit viel Wasser nachgespült werden.
- Die Erstellung einer klinischen Diagnose darf nur auf der Grundlage der klinischen Symptomatik in Verbindung mit weiteren Testergebnissen durch einen Arzt erfolgen.
- Bei der Durchführung von enzymatischen Verfahren zur Bestimmung des Cholesterins und seiner Ester besteht prinzipiell die Möglichkeit der Kontamination und Störung anderer Analyseverfahren auf dem Automaten. Sofern ein solches Phänomen auftritt, ziehen Sie bitte das Handbuch des Geräteherstellers betreffs der Verbesserung der Kanalbelegung und Waschprozeduren des Gerätes zu Rate.
- Artifizielle Lipidmischungen, wie sie als Komponenten von Infusionslösungen (z. B. Intra-lipid®) Verwendung finden, können mit dem Reaktionsprinzip des Wako LDL-C L-Type Tests interferieren. Serumproben von Patienten, die momentan mit solchen Präparaten behandelt werden, sind von der Bestimmung mit dem Wako LDL-C L-Type Reagenz auszuschließen.
- Patientenproben mit einem seltenen Typ von Hyperlipoproteinemia (Hyperlipoproteinemia Typ III) können mit dem LDL-C Type-Reagenz falsche Ergebnisse liefern⁵.
- Proben mit Triglyceridkonzentrationen, die 1.000 mg/dl übersteigen, sollten verdünnt und neu analysiert werden. Verdünnen Sie die Probe mit Kochsalzlösung in einem passenden Verhältnis und analysieren Sie sie neu. Zur Bestimmung des definitiven LDL Resultats der Probe ist der Konzentrationswert der verdünnten Probe mit dem gewählten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.
- Bei Entsorgung der Reagenzien sind die nationalen und örtlichen Vorschriften zu beachten.

Erforderliche, nicht im Lieferumfang erhaltene, Materialien

LDL-C Calibrator
Qualitätskontrollmaterial
Analysenautomat

Kalibrator

Die Sollwerte des Wako LDL-C-Calibrators wurden in Verfahren festgelegt, die ihrerseits auf das nationale Referenzsystem der USA für Cholesterin (National Reference System for Cholesterol, NRS/CHOL) zurückzuführen sind. Zudem liegt der Kalibratorwert im medizinischen Entscheidungsbereich.

Qualitätskontrolle

Eine Qualitätskontrollroutine wird allen klinischen Laboratorien empfohlen. Die Untersuchung von Kontrollseren mit Wertlagen sowohl innerhalb als auch außerhalb des Normbereichs wird für jeden Test zur Kontrolle der Leistung des Tests angeraten. Die für die Kontrollen erzielten Werte müssen in die vom Hersteller angegebenen Bereiche fallen. Falls Werte für noch nicht getestetes Kontrollmaterial ermittelt werden müssen, soll das Labor vorab für jede Wertlage der Kontrollproben eine ausreichende Anzahl Bestimmungen ausführen, um Sollwerte für Mittelwert und Kontrollbereich zu ermitteln.

Referenzbereich

NCEP ATP's Cut-off Werte für LDL-C^{4,5}

Wünschenswert	< 130 mg/dl
Grenzbereich (Hohes Risiko für KHK)	130–159 mg/dl
Hohes Risiko für KHK	160 mg/dl

Leistungsmerkmale

Richtigkeit (Hitachi® 917)

Die Richtigkeit dieser Methode wurde mit einer Wiederfindungsstudie gezeigt.

Erwartet (mg/dl)	Beobachtet (mg/dl)	Wiederfindung (%)
15,0	15,6	104
30,6	31,2	102
76,2	76,1	100

Linearität

Die Linearität des Wako LDL-C L-Type beträgt 1–400 mg/dl. Falls der LDL-C-Wert 400 mg/dl überschreitet, Probe mit physiol. Kochsalzlösung verdünnen (1+1), erneut messen und das Ergebnis mit 2 multiplizieren.

Methodenvergleich

Zum Vergleich des Wako LDL-C L-Type mit der Referenzmethode (Beta-Quantifizierung) und einer kommerziellen homogenen LDL-C-Methode wurden Vergleichsstudien durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studien sind in der folgenden Tabelle detailliert aufgelistet:

Probe	Wako LDL-C L-Type vs. Referenzmethode	Wako LDL-C L-Type vs. Homogener Test LDL-C
Proben	Serum	Plasma
n=	60	60
MW (mg/dl)	$\bar{x} = 136,6; \bar{y} = 137,1$	$\bar{x} = 117,0; \bar{y} = 119,3$
Regressionsanalyse (mg/dl)	$y = 0,97x + 5,12$	$y = 1,018x + 0,135$
Korrelationskoeffizient	$r = 0,983$	$r = 0,988$

Präzision (Hitachi® 917)

In der Serie

Probe #	Replikate	MW (mg/dl)	SD	CV (%)
1	10	101,2	0,62	0,61
2	10	164,5	0,71	0,43

Gesamtpräzision

Drei Qualitätskontrollproben verschiedener Wertlagen wurden in Doppelbestimmung und über einen Zeitraum von 24 Tagen wiederholt bestimmt. Die Daten wurden entsprechend der Richtlinie NCCLS EP5-T2 zusammengestellt.

Anzahl Testtage	MW (mg/dl)	SD	CV (%)	S _w	S _t
24	126,2	0,761	0,60	0,751	1,54
24	225,8	1,229	0,54	1,570	2,77

Sensitivität

Die untere Nachweisgrenze wurde zu 1 mg/dl ermittelt.

Spezifität (Hitachi® 917)

Ascorbinsäure, freies Bilirubin, konjugiertes Bilirubin und Hämoglobin stören diesen Test bei Konzentrationen bis zu 50, 50, 40, bzw. 500 mg/dl nicht.

Ascorbinsäure (mg/dl)	ohne	10	20	30	40	50
LDL-C (mg/dl)	129,8	129,0	129,3	129,4	128,2	128,3
Freies Bilirubin (mg/dl)	ohne	10	20	30	40	50
LDL-C (mg/dl)	103,0	103,6	102,6	102,7	102,6	102,1
Konjug. Bilirubin (mg/dl)	ohne	8	16	24	32	40
LDL-C (mg/dl)	108,7	108,5	108,5	107,5	106,3	106,3
Hämoglobin (mg/dl)	ohne	100	200	300	400	500
LDL-C (mg/dl)	124,9	125,1	125,1	124,6	124,8	124,8

Literatur

- Rifai N, Bachorik PS, and Albers JJ. Lipids, Lipoproteins, and Apolipoproteins. In: Burtis CA, Ashwood ER (eds). Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, 5th Edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2001: PART IV, 24; 463, 480.
- 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: 1434-1503.
- Rifai, N., Warnick, G. R. and Dominiczak, M. H., Ed. Handbook of Lipoprotein Testing. AACC Press, Washington, DC, USA, (1997).
- Bachorik PS. Measurement of low-density lipoprotein cholesterol. In: Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH, eds. Handbook of lipoprotein testing. Washington: AACC Press, 1997. p. 145-160.
- Friedewald, W. T., Levy, R. I. and Frederickson, D. S. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in Plasma without use of the preparative ultracentrifuge. Clin. Chem. 18:499-502 (1972).
- 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. p. 25-48.
- The Expert Panel. Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Arch Intern Med 148: 36-69 (1988).
- The Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Summary of the Second Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II). JAMA. 269:3015-3023 (1993).
- Esteban-Salán M, Guimón-Bardesi A, de la Viuda-Unzueta JM, Azcarate-Ania MN, Pascual-Usandizaga P, Amoroto-Del-Río E, Analytical and Clinical Evaluation of Two Homogeneous Assays for LDL-Cholesterol in Hyperlipidemic Patients. Clin Chem 2000; 46(8), 1121-1131.

Bestellinformation

Best.-Nr.	Produkt	Packung
419-24017	LDL-C L-Type R1	R1: 4 x 60 ml
419-24027	LDL-C L-Type R2	R2: 4 x 20 ml
991-24015	LDL-C L-Type R1	R1: 1 x 500 ml
991-24025	LDL-C L-Type R2	R2: 1 x 500 ml
419-24032	LDL-C Calibrator	CAL: 4 x für 1 ml