

Finalità d'uso

Il test LDL-C L-Type è un test *in vitro* per la determinazione quantitativa del colesterolo a bassa densità di lipoproteine (LDL-C) nel siero e nel plasma.

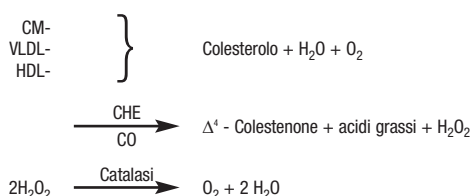
Sommario e spiegazione del test

Da tempo si conosce la relazione esistente tra il livello del colesterolo totale nel sangue e la cardiopatia ischemica (CHD). Negli ultimi anni, oltre al colesterolo totale, il colesterolo ad alta densità di lipoproteine (LDL-C) è diventato un importante strumento utilizzato per valutare un rischio individuale di prognosi della CHD, da quando è stata dimostrata una netta relazione diretta tra i livelli di LDL-C e l'incidenza della CHD¹. Tuttavia esiste un reale interesse nella determinazione del LDL-C, e la maggior parte dei laboratori clinici eseguono il test LDL-C di routine. Il metodo di riferimento attualmente accettato è generalmente conosciuto come "quantificazione beta"², che prevede una ultracentrifugazione. A causa della laboriosità e della dipendenza dalla tecnica questo metodo non viene generalmente utilizzato nella routine. La formula di Friedwald³ è la più utilizzata per scopi di routine. Comunque, poiché la formula ricava la concentrazione dell' LDL-C dalla misura del colesterolo totale, dei trigliceridi e del colesterolo ad alta densità di lipoproteine (HDL-C), il calcolo dell'LDL-C dipende dall'accuratezza e precisione di queste tre misure. Il test Wako LDL-C L-Type è un metodo omogeneo che elimina le fasi di preparazione o calcolo, e perciò, può essere applicato sugli analizzatori automatici.

Principio del metodo

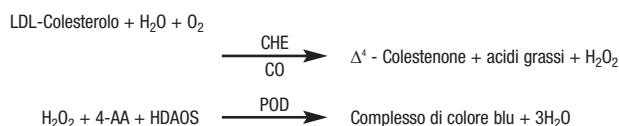
1ª reazione (eliminazione di colesterolo non-LDL)

Quando un campione è mescolato con il reagente enzimatico colorimetrico (R1), il tensioattivo polianionico ed anfotero protegge l'LDL dalle reazioni enzimatiche. La colesterolo esterasi (CHE) e la colesterolo ossidasi (CO) reagiscono con le lipoproteine non-LDL [chilomicroni (CM), lipoproteine a bassa densità (VLDL) e HDL]. Il perossido di idrogeno prodotto dalle reazioni enzimatiche con il colesterolo non-LDL è scisso dalla catalasi contenuta nel reagente enzimatico colorimetrico.



2ª reazione (reazione colorimetrica del colesterolo LDL)

Aggiungendo la soluzione reagente (R2), il reagente di protezione è rimosso dall'LDL e la catalasi è inattivata dal sodio azide (NaN₃). In questa seconda reazione, CHE e CO reagiscono solo con LDL-C. Il perossido di idrogeno prodotto dalle reazioni enzimatiche con LDL-C produce un complesso colorato in seguito alla condensazione dell'ossidasi con N-(2-idrossi-3-sulfopropil)-3,5-dimetossianilina (HDAOS) e 4-aminoantipirina (4-AA) in presenza di perossidasi (POD). Misurando l'assorbanza del complesso colorato blu prodotto, a circa 600 nm, si può determinare la concentrazione dell'LDL-C nel campione comparandola con l'assorbanza del Calibratore LDL-C.



Reagenti

Ingrediente e conservazione

R1: Reagente 1	Reagente enzimatico colorimetrico	Conservare a 2-10 °C
R2: Reagente 2	Soluzione di reazione	Conservare a 2-10 °C (Non congelare)
R1:	Tampone di Good, pH 6,8	25 mmol/L
Reagente enzimatico colorimetrico	CHE (Colesterolo Esterasi, da <i>Pseudomonas</i>)	5.000 U/L
	CO (Colesterolo Ossidasi, da <i>Nocardia</i>)	5.000 U/L
	HDAOS	0,64 mmol/L
	Catalasi (da <i>fegato bovino</i>)	1.000.000 U/L
	Ascorbat-Oxidase (da <i>Acremonium</i>)	5 U/mL
R2a:	Tampone di Good, pH 7,0	25 mmol/L
Soluzione di reazione	4-AA (Aminoantipirina)	3,4 mmol/L
	POD (da <i>rafano</i>)	20.000 U/L
	di Sodio Azide (NaN ₃)	0,095 %

Preparazione dei reagenti

- R1: Il Reagente 1 è pronto all'uso. Il Reagente 1 non aperto è stabile fino alla data di scadenza conservato a 2-10 °C. Una volta aperto può essere usato per un mese a 2-10 °C.
- R2: Il Reagente 2 è pronto all'uso. Il Reagente 2 non aperto è stabile fino alla data di scadenza conservato a 2-10 °C. Una volta aperto può essere usato per un mese a 2-10 °C.
- CAL: Ricostituire un flacone di Calibratore LDL-C con 1 mL di acqua distillata o deionizzata. Conservare il Calibratore LDL-C ricostituito in frigorifero. Il Calibratore LDL-C ricostituito è stabile 7 giorni a 2-10 °C.

Il calibratore può essere aliquotato e congelato dopo ricostituzione una sola volta. Ripetuti congelamenti e scongelamenti dovrebbero essere evitati.

Raccolta e conservazione dei campioni

Utilizzare come campione siero o plasma.

Conservare i campioni a 4 °C prima di analizzarli. I campioni conservati più a lungo dovrebbero essere conservati congelati a -70 °C o a temperature inferiori².

Rispetto ai valori medi determinati su siero quelli determinati su plasma prelevato con litio eparina sono in media più bassi del 3 % circa e quelli su plasma prelevato con EDTA del 9 % circa.

Indicazioni fisiche o chimiche di instabilità

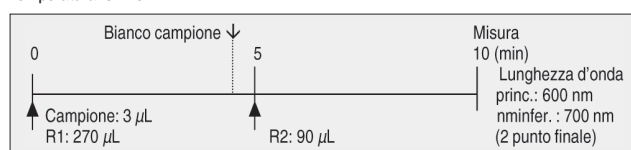
La presenza di precipitati nei reagenti o valori dei sieri di controllo al di fuori dell'intervallo di accettabilità del produttore possono essere un indice di instabilità.

Analizzatori

Il reagente è proposto per essere utilizzato sugli analizzatori automatici in commercio del tipo dell'Hitachi® 917. Per la descrizione del funzionamento e delle specifiche bisogna rifarsi al manuale operativo dell'analizzatore.

Procedura standard

Temperatura: 37 °C



Questa è la procedura standard.

A richiesta sono disponibili applicazioni per gli analizzatori automatici.

Risultati

I risultati finali sono calcolati automaticamente e stampati in unità di concentrazione (mg/dL).

Precauzioni ed avvertenze

- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Solo per uso professionale.
- Non per uso interno umano o animale.
- Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza apposta sulle etichette di ogni flacone di reagente.
- Non utilizzare i reagenti sopra descritti per nessun altro scopo se non per quello qui riportato.
- R2 contiene 0,095 % di sodio azide come stabilizzatore. Il sodio azide può reagire col rame o legarsi al piombo per formare composti esplosivi. Anche se i reagenti contengono piccole quantità di sodio azide gli scarichi dovrebbero essere lavati con acqua abbondante, quando i reagenti sono eliminati.
- Le diagnosi cliniche devono essere determinate dal medico sia sulla base dei sintomi clinici che dei risultati dei test.
- Durante l'esecuzione di procedure enzimatiche per determinare gli esteri del colesterolo, in teoria non possono essere esclusi la possibilità di contaminazione ed interferenza con altri test di chimica clinica utilizzando lo stesso analizzatore. Qualora dovesse verificarsi un fenomeno del genere, consultare il manuale del costruttore dell'apparecchio onde migliorare l'assegnazione del canale e le procedure di lavaggio dell'apparecchio.
- Le miscele artificiali di lipidi utilizzate come componenti di soluzioni per infusioni (p.es. Intralipid®) possono interferire con il principio di reazione del test Wako LDL-C L-Type. I campioni dei pazienti sotto trattamento con questi preparati vanno esclusi dalla determinazione con il reagente Wako LDL-C L-Type.
- I campioni dei pazienti con un tipo raro di iperlipoproteinemia (iperlipoproteinemia tipo III), con il reagente LDL-C Type possono fornire risultati sbagliati².
- Quando il valore dei trigliceridi in un campione supera i 1.000 mg/dL, bisogna diluire il campione con fisiologica, ripetere l'analisi e moltiplicare il risultato per il fattore di diluizione.
- L'eliminazione dei reagenti va eseguita secondo le norme di sicurezza delle autorità locali o nazionali.

Materiali richiesti ma non forniti

Calibratore dell'LDL-C
Materiale per il controllo di qualità
Analizzatori verranno

Calibratore

I valori del Calibratore LDL-C della Wako sono assegnati secondo le procedure riferibili al National Reference System per il Colesterolo (NRS/CHOL) ed il valore del calibratore si riferisce ad un valore clinico.

Controllo qualità

Si suggerisce per tutti i laboratori clinici, un controllo di qualità. Si raccomanda per ogni seduta analitica l'analisi del materiale di controllo sia negli intervalli di normalità che in quelli patologici per monitorare l'esecuzione della procedura. I valori che si ottengono per i controlli dovrebbero cadere negli intervalli di confidenza assegnati dal produttore. Se i valori devono essere assegnati per materiale di controllo a titolo ignoto, il laboratorio dovrebbe analizzare ciascun livello di materiale di controllo un numero sufficiente di volte per stabilire una corretta media ed un intervallo d'accettabilità.

Valori attesi

Valori decisionali per l'LDL-C secondo le linee guida dell'ATP NCEP^{4,5}

Desiderati	< 130 mg/dl
Borderline ad alto rischio di CHD	130-159 mg/dl
Ad alto rischio di CHD	160 mg/dl

Caratteristiche della prestazione

Accuratezza (Hitachi® 917)

L'accuratezza di questo metodo è stata dimostrata con uno studio di prove di recupero.

Attesi (mg/dL)	Osservati (mg/dL)	Recupero (%)
15,0	15,6	104
30,6	31,2	102
76,2	76,1	100

Linearità

La linearità del LDL-C L-Type della Wako va da 1 a 400 mg/dL. Se il valore dell'LDL-C supera i 400 mg/dL, il campione va diluito 1:1 con soluzione fisiologica, ripetuta l'analisi, e moltiplicato il risultato per 2.

Comparazione

Sono stati fatti degli studi di comparazione tra il metodo Wako LDL-C L-Type, il metodo di riferimento (quantificazione-beta) ed un metodo omogeneo per l'LDL-C reperibile in commercio. I risultati di questi tre studi sono riportati nella sottostante tabella.

Methodo	Wako LDL-C L-Type contro Metodo di Riferimento		
	Wako LDL-C L-Type contro Siero	Wako LDL-C L-Type contro Plasma	Metodo di Riferimento
Campione			
n=	60	60	60
Media (mg/dL)	$\bar{x} = 136,6; \bar{y} = 137,1$	$\bar{x} = 117,0; \bar{y} = 119,3$	$\bar{x} = 109,1; \bar{y} = 110,8$
Analisi di regressione (mg/dL)	$y = 0,97x + 5,12$	$y = 1,018x + 0,135$	$y = 0,98x + 4,18$
Coefficiente di correlazione	$r = 0,983$	$r = 0,986$	$r = 0,988$

Precisione (Hitachi® 917)

Precisione tra le serie (within-run)

Campione#	Ripetizioni	Media (mg/dL)	SD	CV (%)
1	10	101,2	0,62	0,61
2	10	164,5	0,71	0,43

Precisione totale

Sono stati analizzati in doppio tre livelli di controllo e sempre in doppio analizzati per 24 giorni. I risultati sono stati raccolti seguendo le linee guida del NCCLS EPS-T2.

No. dei giorni	Media (mg/dL)	SD	CV (%)	S _{tot}	S _r
24	126,2	0,761	0,60	0,751	1,54
24	225,8	1,229	0,54	1,570	2,77

Sensibilità

La minima quantità rilevabile con questo metodo è stimata in 1 mg/dL.

Specificità (Hitachi® 917)

L'acido ascorbico, la bilirubina diretta, la bilirubina coniugata e l'emoglobina non interferiscono con il metodo rispettivamente a livelli superiori a 50, 50, 40 e 500 mg/dL.

Acido Ascorbico (mg/dL)	Assent	10	20	30	40	50
LDL-C (mg/dL)	129,8	129,0	129,3	129,4	128,2	128,3
Bilirubina Diretta (mg/dL)	Assent	10	20	30	40	50
LDL-C (mg/dL)	103,0	103,6	102,6	102,7	102,6	102,1
Bilirubina Coniugata (mg/dL)	Assent	8	16	24	32	40
LDL-C (mg/dL)	108,7	108,5	108,5	107,5	106,3	106,3
Emoglobina (mg/dL)	Assent	100	200	300	400	500
LDL-C (mg/dL)	124,9	125,1	125,1	124,6	124,8	124,8

Bibliografia

- 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. AAC 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: AAC 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: AAC 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.

Informazioni per ordinare

Codice N° Prodotto Confezionamento

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 per 1 mL