

Utilisation

LDL-C L-Type est un réactif de diagnostic *In Vitro* pour le dosage quantitatif des lipoprotéines de basse densité du cholestérol (LDL-C) dans le sérum et le plasma sur systèmes photométriques.

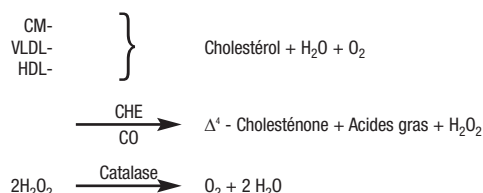
Intérêt clinique

On sait depuis longtemps que le taux du cholestérol total dans le sang est associé aux maladies cardiovasculaires (CHD). Ces dernières années, le LDL-cholestérol (LDL-C) est devenu, en plus du cholestérol total, un paramètre important pour l'évaluation du risque individuel de maladies coronariennes ; en effet, on signale une forte relation positive entre la concentration en LDL-C et la survenue d'affections coronariennes¹. Un intérêt croissant s'est manifesté pour la mesure du LDL-C et la plupart des laboratoires de biologie clinique pratiquent cette analyse en routine. La méthode actuellement considérée comme méthode de référence, qualifiée de „beta quantification“^{2,3}, implique une ultracentrifugation. De par sa lourdeur technique, elle n'est généralement pas utilisée en routine. C'est la formule de Friedewald⁴ qui est le plus souvent utilisée pour les dosages de routine. Cependant, cette formule conduit à une estimation du LDL-C à partir des mesures du cholestérol total, des triglycérides et du HDL-C. Ce calcul du LDL-C dépend de l'exactitude et de la précision des trois mesures. Le test Wako LDL-C L-Type est une méthode en phase homogène, qui élimine les étapes préparatoires ou le calcul. Cette méthode s'applique directement aux analyseurs automatiques.

Principe de la méthode

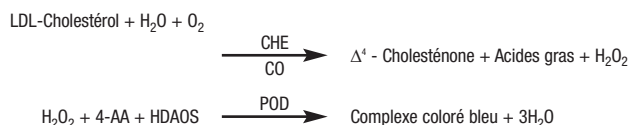
1^{ère} réaction (élimination du cholestérol non-LDL)

Lorsqu'un échantillon est mélangé avec le Réactif Enzymatique Coloré (R1), les polyanions et le surfactant amphotérique protègent les LDL des réactions enzymatiques. La Cholestérol estérase (CHE) et la cholestérol oxydase (CO) réagissent avec les lipoprotéines non-LDL [chylomicrons (CM), lipoprotéines de très faible densité (VLDL) et HDL]. Le peroxyde d'hydrogène produit par les réactions enzymatiques avec le cholestérol non-LDL est décomposé par la catalase du Réactif Enzymatique Coloré.



2^{ème} réaction (réaction colorée du LDL cholestérol)

Lorsqu'on ajoute la Solution Réactive (R2), le réactif protecteur est écarté des LDL et la catalase est inactivée par l'azide de sodium (NaN₃). Dans cette seconde étape, la CHE et la CO ne réagissent qu'avec le LDL-C. Le peroxyde d'hydrogène produit par les réactions enzymatiques avec le LDL-C forme un complexe coloré par condensation oxydative avec la N-(2-hydroxy-3-sulfo-propyl)-3,5-diméthoxyaniline (HDAOS) et la 4-aminoantipyrine (4-AA) en présence de peroxydase (POD). En mesurant l'absorbance du complexe coloré bleu produit, à environ 600 nm, on peut calculer la concentration du LDL-C dans l'échantillon en comparant avec l'absorbance du Calibrateur LDL-C.



Réactifs

Composants et concentrations

R1 :	Réactif Enzymatique Coloré	A conserver entre 2-10 °C
R2 :	Solution réactive	A conserver entre 2-10 °C
R2 et R2		(Ne pas congeler les réactifs)
R1 :	Tampon de Good, pH 6,8	25 mmol/l
Réactif	CHE (Cholestérol estérase, de <i>Pseudomonas</i>)	5.000 U/l
Enzymatique Coloré	CO (Cholestérol oxydase, de <i>Nocardia</i>)	5.000 U/l
	HDAOS	0,64 mmol/l
	Catalase (de foie de boeuf)	1.000.000 U/l
	Ascorbate Oxydase (d' <i>Acremonium</i>)	5 U/ml
R2a :	Tampon de Good, pH 7,0	25 mmol/l
Solution réactive	4-AA (Aminoantipyrine)	3,4 mmol/l
	POD (Peroxydase de raifort)	20.000 U/l
	Azide de Sodium (NaN ₃)	0,095 %

Préparation et conservation des réactifs

R1 : Le Réactif 1 est prêt à l'emploi. Avant ouverture, le Réactif 1 est stable, conservé entre 2-10 °C, jusqu'à la date de péremption. Après ouverture, le Réactif 1 peut être utilisé pendant un mois, s'il est conservé entre 2-10 °C.

R2 : Le Réactif 2 est prêt à l'emploi. Avant ouverture, le Réactif 2 est stable, conservé entre 2-10 °C, jusqu'à la date de péremption. Après ouverture, le Réactif 2 peut être utilisé pendant un mois, s'il est conservé entre 2-10 °C.

CAL : Reconstituer un flacon de LDL-C Calibrateur avec 1 ml d'eau distillée ou désionisée. Conserver le calibrateur LDL-C reconstitué au réfrigérateur.

Le calibrateur LDL-C reconstitué se conserve 7 jours entre 2-10 °C. Le calibrateur peut être aliquoté et congelé une seule fois après reconstitution. Éviter les congélations et décongélations répétées.

Prélèvement et conservation des échantillons

Utiliser le sérum ou le plasma hépariné comme échantillon.

Conserver l'échantillon à 4 °C avant le dosage. Pour une conservation prolongée, congeler l'échantillon à -70 °C ou au-delà.

Les valeurs obtenues sur du plasma recueilli sur héparinate de lithium sont en moyenne de 3 % plus basses que les concentrations sériques. Pour du plasma sur EDTA, les valeurs obtenues seront d'environ 9 % inférieures à celles de sérums.

Signes physiques et chimiques d'instabilité

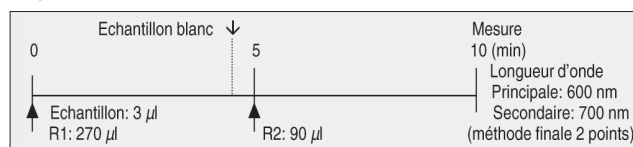
La présence de précipités dans les réactifs ou l'obtention de valeurs de sérums de contrôle en dehors des valeurs annoncées par le fabricant peuvent signifier une instabilité du réactif.

Instrumentation

Le test LDL-C L-Type est destiné à une utilisation sur les analyseurs automatiques présents sur le marché, comme par exemple l'analyseur Hilachi® 917. Pour une description de l'instrument et de ses spécifications, consulter le manuel opératoire.

Mode opératoire

Température : 37 °C



Ceci correspond à la procédure standard.

Les applications par instrument sont disponibles sur demande.

Résultats

Les résultats finaux sont automatiquement calculés et exprimés en unités de concentration (mg/dl).

Avertissements et précautions d'emploi

- Utilisation pour diagnostic *In vitro* seulement.
- Réservé à l'usage professionnel.
- A ne pas utiliser *In vivo* sur l'homme ou l'animal.
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption indiquée sur l'étiquette de l'emballage de chaque réactif.
- Ne pas utiliser les réactifs décrits ci-dessus pour un quelconque usage autre que celui ici décrit.
- R2 contient de l'azide de sodium (0,095 %) comme agent de conservation. L'azide de sodium peut former des mélanges explosifs avec le cuivre ou le plomb. Même si les réactifs ne contiennent qu'une quantité minimale d'azide de sodium, les tuyaux d'écoulement doivent être rincés abondamment avec de l'eau lors de l'élimination des réactifs.
- Le diagnostic clinique sera effectué par un médecin sur la base de symptômes cliniques et d'autres résultats d'analyse.
- En cas d'utilisation de méthodes enzymatiques pour le dosage des esters du cholestérol, on ne peut pas exclure une éventuelle contamination ou interférence avec d'autres tests de chimie clinique réalisés sur le même analyseur. Si un tel problème survient, se reporter au manuel de l'instrument pour le choix des canaux et les procédures de lavage.
- Les préparations artificielles de lipides contenues dans certaines solutions intraveineuses (par exemple Intralipid®) peuvent interférer avec le principe du test Wako LDL-C L-Type. Les échantillons de patients suivant ce traitement doivent en être exclus.
- Les échantillons de patients souffrant d'un type rare d'hyperlipoprotéinémie (Hyperlipoprotéinémie de Type III) peuvent donner des résultats erronés avec le réactif direct LDL-C L-Type®.
- Les échantillons dont la concentration en triglycérides dépasse 1.000 mg/dl doivent être dilués et réanalysés. Diluer l'échantillon avec de l'eau physiologique et refaire l'analyse. Le résultat définitif de LDL s'obtient en multipliant la concentration de l'échantillon dilué par le facteur de dilution.
- Pour éliminer les réactifs, les traiter selon les réglementations locales ou nationales en vigueur.

Matériels requis mais non fournis

Calibrateur LDL-C
Matériel de contrôle de qualité
Analyseur automatique

Calibrateur

Les valeurs du Calibrateur Wako LDL-C ont été définies selon le protocole de référence établi pour le Cholestérol (NRS/CHOL) et sont proches des niveaux de décision médicale.

Contrôle de qualité

Un contrôle de qualité est recommandé pour tous les laboratoires d'analyses. Un sérum de contrôle normal et anormal est recommandé pour chaque test afin de contrôler la performance du dosage. Les valeurs obtenues pour les contrôles doivent se situer dans les limites acceptables données par le fabricant. Si des valeurs doivent être définies sur un contrôle non titré, le laboratoire doit passer ce sérum un certain nombre de fois afin de définir une valeur moyenne pertinente et une fourchette acceptable.

Valeurs usuelles

Classification du risque cardio-vasculaire en référence à NCEP pour LDL-C^{4,5}

Risque faible	< 130 mg/dl
Risque intermédiaire	130–159 mg/dl
Risque élevé	160 mg/dl

Performances

Exactitude (Hitachi® 917)

L'exactitude de cette méthode a été démontrée par une étude de recouvrement.

Valeur attendue (mg/dl)	Valeur observée (mg/dl)	Recouvrement (%)
15,0	15,6	104
30,6	31,2	102
76,2	76,1	100

Linéarité

Le test Wako LDL-C L-Type est linéaire jusqu'à 400 mg/dl. Au delà de cette valeur, diluer l'échantillon 1 + 1 avec du soluté NaCl (g/l) et multiplier le résultat par 2.

Comparaison de méthodes

Des études de comparaison ont été effectuées avec la méthode de référence (beta-quantification) et avec une méthode en phase homogène disponible sur le marché. Leurs résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Méthode:	Wako LDL-C L-Type vs. méthode de référence		Wako LDL-C L-Type vs. Test phase homogène LDL-C	
	Sérum	Plasma	Sérum	Plasma
n=	60	60	60	60
VM (mg/dl)	$\bar{x} = 136,6; \bar{y} = 137,1$	$\bar{x} = 117,0; \bar{y} = 119,3$	$\bar{x} = 109,1; \bar{y} = 110,8$	
Régression (mg/dl)	$y = 0,97x + 5,12$	$y = 1,018x + 0,135$	$y = 0,98x + 4,18$	
Coefficient de corrélation	$r = 0,983$	$r = 0,986$	$r = 0,988$	

Etude de précision (Hitachi® 917)

Précision intra-série	Répliques	MW (mg/dl)	Moyenne	SD	CV (%)
Echantillon 1	10	101,2	101,2	0,62	0,61
Echantillon 2	10	164,5	164,5	0,71	0,43

Précision totale

Sur une durée de 24 jours, trois niveaux de sérum de contrôle sont mesurés en double et sur deux séries. Les résultats sont exprimés selon la directive NCCLS EP5-T2.

No. de jours de tests	MW (mg/dl)	Moyenne	SD	VK (%)	S _w	S _r
24	126,2	126,2	0,761	0,60	0,751	1,54
24	225,8	225,8	1,229	0,54	1,570	2,77

Sensibilité / Limite de détection

La limite de détection analytique est de 0,01 g/l (1 mg/dl).

Spécificité / Interférences (Hitachi® 917)

L'acide ascorbique, la bilirubine libre, la bilirubine conjuguée et l'hémoglobine sont sans influence sur le dosage jusqu'aux concentrations respectives de 50, 50, 40, et 500 mg/dl.

Acide Ascorbique (mg/dl)	Sans	10	20	30	40	50
LDL-C (mg/dl)	129,8	129,0	129,3	129,4	128,2	128,3
Bilirubine Libre (mg/dl)	Sans	10	20	30	40	50
LDL-C (mg/dl)	103,0	103,6	102,6	102,7	102,6	102,1
Bilirubine Conjuguée (mg/dl)	Sans	8	16	24	32	40
LDL-C (mg/dl)	108,7	108,5	108,5	107,5	106,3	106,3
Hémoglobine (mg/dl)	Sans	100	200	300	400	500
LDL-C (mg/dl)	124,9	125,1	125,1	124,6	124,8	124,8

Références bibliographiques

- 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.

Présentation

Référence	Produit	Taille coffret
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 pour 1 ml