

#### Uso

La prueba del LDL-C L-Type es un ensayo *In Vitro* para la determinación cuantitativa del colesterol unido a las lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) en suero y plasma.

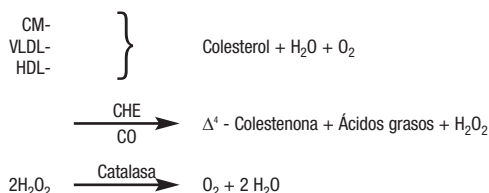
#### Resumen y explicación del ensayo

Desde hace mucho tiempo se sabe que los niveles de colesterol total en sangre están relacionados con la enfermedad coronaria (EC). En los últimos años, contamos con una herramienta adicional para estimar el riesgo de padecer EC. En efecto, se ha demostrado una intensa relación positiva entre las concentraciones de LDL-Colesterol (LDL-C) y la incidencia de EC<sup>1</sup>. Por tanto, existe un gran interés en el análisis del LDL-C, determinación realizada de forma rutinaria en la mayoría de los laboratorios clínicos. El método de referencia comúnmente aceptado es la „beta cuantificación“<sup>2</sup>, el cual implica utilizar la ultracentrifugación. Dado que se trata de un método muy laborioso que requiere instrumentación costosa, no se utiliza en las determinaciones rutinarias. Para este propósito, el sistema más utilizado es la fórmula de Friedewald<sup>3</sup>. Sin embargo, teniendo en cuenta que la fórmula estima el LDL-C a partir de las determinaciones de colesterol total, triglicéridos y el colesterol unido a la lipoproteína de alta densidad (HDL-C), la fiabilidad del cálculo del LDL-C dependerá de la exactitud y precisión de las tres determinaciones implicadas. El LDL-C tipo líquido de Wako es un ensayo homogéneo, que elimina los pasos previos al cálculo y en consecuencia puede ser aplicado a los analizadores automáticos.

#### Principio del método

##### La primera reacción (eliminación de colesterol no-LDL)

Cuando la muestra se mezcla con el Reactivo del Color de la Enzima (R1), el reactivo protector se une al LDL y le protege de las reacciones enzimáticas. La Colesterol esterasa (CHE) y la Colesterol oxidasa (CO) reaccionan con las lipoproteínas distintas del LDL (quilomicrones (CM), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y HDL. El peróxido de hidrógeno producido por las reacciones enzimáticas con el colesterol no LDL se descompone por la acción de la catalasa contenida en el Reactivo 1.



##### La segunda reacción (colorean la reacción de colesterol LDL)

Cuando se añade el Reaccionar la Solución (R2), se elimina el reactivo de protección, se retira del LDL y se inactiva la catalasa por la azida sódica (NaN<sub>3</sub>). En este segundo proceso, CHE y CO reaccionan únicamente con el LDL-C. El peróxido de hidrógeno producido por las reacciones enzimáticas con el LDL-C proporciona un complejo azulado tras la condensación oxidativa del HDAOS (N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina) y de la 4-aminoantipirina (4-AA) en presencia de peroxidasa (POD). Midiendo la absorbancia del complejo azulado producido, a aproximadamente 600 nm., se calcula la concentración de LDL-C en la muestra, comparando con la absorbancia del Calibrador LDL-C.



#### Reactivos

##### Contenido y concentraciones

<b>R1:</b>	Reactivo del Color de la Enzima	Mantener a 2–10 °C
<b>R2:</b>	R2: Reaccionar la Solución	Mantener a 2–10 °C
<b>R2 y R2</b>		(No congelar)
<b>R1:</b> Reactivo del Color de la Enzima	Tampón Good, pH 6,8 CHE ( <i>Esterasa de colesterol, de Pseudomonas</i> ) CO ( <i>Oxidasa de colesterol, de Nocardia</i> ) HDAOS Catalasa ( <i>de hígado bovino</i> ) Oxidasa de ascorbato ( <i>de Acremonia</i> )	25 mmol/L 5.000 U/l 5.000 U/l 0,64 mmol/L 1.000.000 U/l 5 U/ml
<b>R2a:</b> Reaccionar la Solución	Tampón Good, pH 7,0 4-AA (Aminoantipirina) POD (Peroxidasa, <i>de rábano picante</i> ) Azida Sódica (NaN <sub>3</sub> )	25 mmol/L 3,4 mmol/L 20.000 U/l 0,095 %

#### Preparación de los reactivos

- R1:** Se suministra listo para usar. Mantenido a 2–10 °C es estable hasta la fecha de caducidad. Una vez abierto, se puede utilizar durante 1 mes a 2–10 °C.
- R2:** Se suministra listo para usar. Mantenido a 2–10 °C es estable hasta la fecha de caducidad. Una vez abierto, se puede utilizar durante 1 mes a 2–10 °C.
- CAL:** Reconstituir un vial de calibrador LDL-C con 1 mL de agua destilada o desionizada. Mantener el calibrador en el refrigerador. El calibrador reconstituido es estable durante 7 días a 2–10 °C.

El calibrador puede ser alícuotado y congelado una sola vez. No debe descongelarse y congelarse de nuevo.

#### Obtención y preparación de la muestra

Utilizar suero o plasma heparinizado como muestra.

Mantener la muestra a 4 °C antes de su análisis. Para conservaciones prolongadas, las muestras deben congelarse a -70 °C o temperatura inferior<sup>2</sup>.

Los valores en plasma heparina-litio son por término medio un 3 % inferiores a los obtenidos en suero. En plasma EDTA los valores serán un 9 % inferiores a los obtenidos en suero..

#### Indicios de inestabilidad física o química

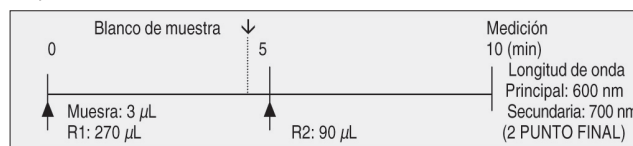
La presencia de precipitados en los reactivos o la obtención de valores de suero control fuera de lo establecido por el fabricante puede ser una indicación de inestabilidad en el reactivo.

#### Instrumentación

El reactivo LDL-C se ha diseñado para su utilización en los analizadores (Hitachi® 917) disponibles en el mercado. Consultar el manual de instrucciones para obtener una descripción de su utilización y especificaciones.

#### Procedimiento

Temperatura: 37 °C



El procedimiento estándar anterior es un ejemplo.

Aplicaciones para autoanalizadores están disponibles bajo pedido.

#### Resultados

Los resultados finales se calculan automáticamente y se imprime en unidades de concentración (mg/dL).

#### Advertencias y precauciones

- Para diagnóstico *in vitro*.
- Para uso profesional.
- No utilizar internamente en personas o animales
- No emplear reactivos que hayan superado la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de cada envase.
- No emplear los reactivos descritos anteriormente para propósitos diferentes al indicado.
- R2 contiene azida sódica (0,095 %) como estabilizador. La azida sódica puede reaccionar con las tuberías de cobre o plomo para formar compuestos explosivos. A pesar de que los reactivos contienen cantidades mínimas de azida sódica, se debe utilizar una gran cantidad de agua en el momento de su eliminación.
- El diagnóstico clínico debe ser determinado por un médico analizando los síntomas clínicos y otros resultados de prueba.
- Al utilizar métodos enzimáticos para la determinación de esteros de colesterol, en principio no deben excluirse la contaminación y la interferencia con otros ensayos químicos clínicos. En caso de que esto ocurriera, hay que referirse al manual del instrumento para el ajuste de canales y las opciones de procedimiento de lavado.
- Mezclas lipídicas artificiales contenidas en determinadas soluciones para infusión intravenosa (por ejemplo Intralipid®) pueden interferir con el kit Wako LDL-C L-Type. Las muestras de pacientes bajo tratamiento habitual con estas soluciones deben ser excluidas.
- Muestras de pacientes con un tipo raro de hiperlipoproteinemia (Hiperlipoproteinemia Tipo III) pueden proporcionar resultados erráticos con el reactivo LDL-C Type®.
- Las muestras con concentraciones de triglicéridos superiores a 1.000 mg/dL deben ser diluidas y reanalizadas. Diluir la muestra con solución salina de acuerdo con la concentración de triglicéridos y reanalizar. Para obtener el resultado definitivo de LDL, multiplicar la concentración de la muestra diluida el factor de dilución.
- Al desechar los reactivos hay que tener en cuenta las normativas locales o nacionales..

#### Materiales necesarios pero no suministrados

Calibrador LDL-C  
Material de control de calidad  
Analizador automatizado

#### Calibrador

Los valores del Calibrador Wako LDL-C se han asignado por procedimientos con trazabilidad con el NRS/CHOL (Sistema de Referencia Nacional para Colesterol) y el valor del calibrador se encuentra en torno al nivel de decisión médica.

#### Control de calidad

Se recomienda un programa de control de calidad para todos los laboratorios clínicos. Para monitorizar el funcionamiento de la técnica, se recomienda el análisis de materiales de control en rangos normales y patológicos. Los valores obtenidos deben estar entre los márgenes indicados por el fabricante. Si el material de control no tiene valores establecidos, el laboratorio deberá realizar el número de análisis necesario para obtener un valor central y un rango aceptable.

#### Valores esperados

##### Decisión NCEP ATP's Puntos de corte para el LDL-C<sup>45</sup>

Deseable	< 130 mg/dl
Zona límite de riesgo <i>cardio-vascular</i>	130–159 mg/dl
Alto riesgo <i>cardio-vascular</i>	160 mg/dl

#### Prestaciones analíticas

##### Exactitud (Hitachi® 917)

La exactitud de este método fue demostrada por ensayos de recuperación.

Esperado (mg/dL)	Observado (mg/dL)	Recuperación (%)
15,0	15,6	104
30,6	31,2	102
76,2	76,1	100

##### Linealidad

La linealidad de del LDL-C L-Type es de 1–400 mg/dL. Si la concentración excede los 400 mg/dL, diluir la muestra 1:1 con solución salina, repetir el ensayo y multiplicar el resultado por 2.

##### Comparación

Se realizaron estudios de comparación entre el LDL-C L-Type de Wako, y el método de referencia (beta-cuantificación). Los resultados se recogen en la siguiente tabla:

Método:	Wako LDL-C L-Type vs. Método de Referencia		LDL-C tipo líquido de Wako frente a LDL-C homogéneo	
	Suero	Plasma	Suero	Plasma
n=	60	60	60	60
Media (mg/dL)	$\bar{x} = 136,6; \bar{y} = 137,1$	$\bar{x} = 117,0; \bar{y} = 119,3$	$\bar{x} = 109,1; \bar{y} = 110,8$	
Análisis de Regresión (mg/dL)	$y = 0,97x + 5,12$	$y = 1,018x + 0,135$	$y = 0,98x + 4,18$	
Coefficiente de Correlación	$r = 0,983$	$r = 0,986$	$r = 0,988$	

##### Precisión (Hitachi® 917)

###### Precisión intraensayo

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

###### Precisión total

Durante un periodo de 24 días se procesaron por duplicado y en tandas dobles 3 niveles de control. Los datos se recogieron de acuerdo con la guía NCCL EPS5-T2.

Número de días de ensayo	Media (mg/dL)	SD	CV (%)	S <sub>wr</sub>	S <sub>r</sub>
24	126,2	0,761	0,60	0,751	1,54
24	225,8	1,229	0,54	1,570	2,77

##### Sensibilidad

El nivel mínimo detectable de este método se estima en 1 mg/dL.

##### Especificidad (Hitachi® 917)

El ácido ascórbico, la bilirrubina libre y conjugada, y la hemoglobina no interfieren la prueba a niveles tales como 50, 50, 40, y 500 mg/dL respectivamente.

Ácido Ascórbico (mg/dL)	Ninguno	10	20	30	40	50
LDL-C (mg/dL)	129,8	129,0	129,3	129,4	128,2	128,3
Bilirrubina Libre (mg/dL)	Ninguno	10	20	30	40	50
LDL-C (mg/dL)	103,0	103,6	102,6	102,7	102,6	102,1
Bilirrubina Conjugado (mg/dL)	Ninguno	8	16	24	32	40
LDL-C (mg/dl)	108,7	108,5	108,5	107,5	106,3	106,3
Hemoglobina (mg/dL)	Ninguno	100	200	300	400	500
LDL-C (mg/dL)	124,9	125,1	125,1	124,6	124,8	124,8

#### Referencias

- 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.

#### Presentaciones

Código N°	Producto	Presentación
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 por 1 mL