

LDL- COLESTEROL DIRECTMetoda enzimatica colorimetrica
ENDPOINTDoar pentru utilizarea *in vitro***CONTINUT**

1142005	LDL-Colesterol	40 mL
1142010	LDL-Colesterol	320 mL

REF

PRINCIPIUL

Metoda directa ^{1, 2} pentru cantarirea colesterolului determinat prin densitatea scazuta a lipoproteinelor (LDL) reprezinta un test enzimatic omogen in care este evitata precipitarea diferentiata si alte sedimentari ale restului de lipoproteine si quilomicroni.

Metoda include doi pasi. In primul pas colesterolul din lipoproteine, altull decat LDL-ul din proba test, sunt descompusi de catre actiuni simultane ale colesterol esterazei (CE) si colesterol oxidaza (CO) la un pH 7.0, dand ca produsi finali colestonon si hidrogen peroxid. Hidrogenul peroxid este descompus mai departe in apa si oxigen cataliza.

In al doilea pas surfactantul, care actioneaza in mod specific asupra LDL-ului, este adaugat la produsul de reactie din primul pas, acesta fiind restul de colesterol cuantificat de o reactie de tip Trinder in care derivatul anilin, HDAOS *, si 4-aminoantipirine (4 AA), acesta este un reactiv de legatura, sunt condensati de H₂O₂ in prezenta de peroxidaza (POD) ca sa formeze quinonemina de culoare rosie proportionala cu concentratia de colesterol-LDL prezent in proba.

* N-(2- hidroxid-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina

CONSTITUENTI SI COMPOZIT

R1 Enzima reactiv. Solutie tampon GOOD 100 mmol/L pH 7.0, CE 800 U/L, CO 500 U/L, catalaza 200 KU/L, HDAOS 0.7 mmol/L, surfactant 0.1% (v/v)

R2 Reactiv POD/4-AA. POD 4 KU/L, 4-AA 4 mmol/L, N₂Na < 0.1%, surfactant specific 0.1% (v/v).

R3 Calibrator LDL/HDL. Optativ REF 1972005.

CONSERVARE SI STABILITATE

Se pastreaza la 2-8°C.

Reactivii sunt stabili pana la data expirarii inscrisa pe eticheta daca contaminarea este evitata dupa deschiderea fiolelor.

PROBE

Ser, EDTA sau plasma heparinizata obtinuta de al pacient dupa o noapte in care nu a mancat nimic. Mutati din celule intr-un interval de 3 ore prin venipunctura. Probele pot fii depozitate la 4-8°C timp de 2 saptamani sau la -20°C timp de 3 luni.

PREPARAREA REACTIVULUI

Reactivii R1 si R2 sunt gata de a fii folositi. Stabilitatea inscrisa pe display-ul analizorului este la 2-12°C timp de 1 luna.

Calibrator: Reconstituiti o fiola adaugand exact 1.0 mL de apa distilata. Agitati cu grija si lasati sa stea timp de 5 minute inainte de folosire. Materialul reconstituit este stabil timp de 7 zile la 2-8°C sau timp de 1 luna la -20°C. Aruncati amestecul in care acesta devine tulbure sau in cazul in care este vreo dovada de contaminare cu microbi.

Calibratorul a fost preparat din ser uman ce s-a demonstrat a fii negativ la HbsAg, HCV si non-reactiv pentru anticorpi HIV. Manevrati cu aceeaasi grija ca si in cazul probelor luate de la pacienti.

INTERFERENTE

Testul un este afectat de hemoglobina (>500 mg/dL), bilirubina (>30 mg/dL), lipide (trigliceride>1000 mg/dL) si colesterol (.450 mg/dL).

MATERIALE DE LUCRU

- Fotometru sau spectrofotometru capabil sa masoare o absorbanta la 600±10nm.
- Temperatura constanta in incubator setata la 37°C
- Cuvete cu drum optic de 1 cm.
- Pipete pentru masurarea reactivului si a probelor.

METODA DE LUCRU

1. Aduceti reactivii si probele la temperatura camerei
2. Pipetati intr-o cuveta:

Cuvete	Blanc	Proba	Calibrator
R1	300 µL	300 µL	300 µL
Proba	-	4µL	-
CAL	-	-	4 µL

3. Amestecati si incubati timp de 5 minute la 37°C.
4. Adaugati:

R2	100 µL	100 µL	100 µL
-----------	--------	--------	--------

5. Amestecati foarte bine si incubati mai mult de 5 minute la 37°C.
6. Cititi absorbanta (A) a probei si a calibratorului la 600 nm fata de reactivul blanc.

METODA DE CALCUL

$$\frac{A_{\text{Proba}}}{A_{\text{Calibrator}}} \times C_{\text{Calibrator}} = \text{mg/dL LDL-colesterol}$$

In cazul in care rezultatele obtinute trebuiesc sa fie exprimate in unitati SI se aplica formula:

$$\text{mg/dL} \times 0.259 = \text{mmol/L}$$

VALORI DE REFERINTA ⁴

Clasificarea grupului de risc conform nivelelor de LDL-C

LDL-nivele de colesterol	RISC
<100 mg/dL (2.59 mmol/L)	Optim
100-129 mg/dL (2.59-3.34 mmol/L)	Aproape optim
130-159 mg/dL (3.37-4.12 mmol/L)	Nivel scazut
160-189 mg/dL (4.14-4.89 mmol/L)	Nivel inalt
≥ 190 mg/dL (4.92 mmol/L)	Nivel foarte inalt

SEMNFICATIA MEDICALA

Investigatii de laborator, epidemiologii si factori genetici de hipercolesterolemie indica faptul ca un nivel de LDH colesterol ridicat reprezinta o cauza importanta in boli de inima coronariene (BIC). Relatia dintre nivelul de LDH-colesterol si BIC riscul este continuu peste valoarea de prag de LDH de la valori scazute la valori ridicate.

Analize clinice recente au demonstrat in mod evident ca terapia cu LDH scazut reduce riscul de BIC. Din aceste motive Tabelul de Tratament pentru Adulti III continua sa identifice colesterol LDL crescut ca fiind principalul plan care foloseste in terapia pentru scaderea nivelului de colesterol.

PERFORMANTELE ANALIZEI

- **Linearitate.** Pana la 500 U/L
- **Precizie.** Coeficientul variatiei din testul ce se afla in derulare (N=10) se gaseste in general cu o valoare mai mica de 3%.
- **Sensibilitate:** Folosind acest reactiv/proba de 1:75:25 la 600 nm, 100 mg/dL de colesterol va produce o absorbanta neta dintre 0.090/0.150.
- **Corelare:** Aceasta analiza (y) a fost comparata cu o metoda similara comerciala (x). Rezultate obtinute:

$$r = 0.997, \quad y = 0.987x + 1.4$$

REFERINTE

1. US Patent No.: 6,194,164 B1 (Feb 27,2001).
2. Sachiko Izawa. J.Med. and Pharm. Sci. 37 : 1325 (1997).
3. SPECIAL REPORT. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA. 285 : 2486 (2001).

