

Direkt enzimátikus meghatározás szelektív védelem után, az LDL-koleszterin (LDL-C) kvantitatív meghatározására szérumban és plazmában.

A meghatározás elve

Ha a mintát az 1. reagenssel elegyítik, a benne lévő védő (maszkírozó) anyag az LDL-hez kötődik és megvédi az enzimreakcióktól. A koleszterin-észteráz (CHE) és a koleszterin-oxidáz (CO) reagál a nem-LDL-lipoproteinekkel [chylomikronok (CM), nagyon-kis-sűrűségű-lipoproteinek (VLDL) és HDL]. Az enzimreakciók révén a nem-LDL-koleszterinből keletkező hidrogén-peroxidot elbontja az 1. reagensben lévő kataláz. A 2. reagens hozzáadására a védő-(maszkírozó) anyag leválik az LDL-ről és a kataláz inaktiválja a nátrium-azid (NaN₃). Ebben a második lépésben a CHE és a CO kizárólag csak a LDL-C-nel reagál. Az enzimreakció hatására a LDL-C-ből keletkezett hidrogén-peroxid peroxidáz (POD) jelenlétében oxidatív kondenzációt közvetít a N-(2-hidroxi-3-szulfopropil)-3,5-dimetoxianilin (HDAOS) és a 4-aminoantipirin (4AA) között és egy színes komplex képződéséhez vezet. A kék színű komplex abszorpcióját körülbelül 600 nm-en mérve és a LDL-C kalibráló abszorpciójával összehasonlítva kiszámítható a minta LDL-C koncentrációja.

Referencia-értéktartomány

A kívánt érték:	< 130 mg/dl	< 3,4 mmol/l
Megnövekedett veszély koronáriás szívbetegségekre:	130-159mg/dl	3,36-4,1mmol/l
Nagy veszély a koronáriás szívbetegségekre:	≥160 mg/dl	≥4,1 mmol/l

Reagens

1. Reagens

25 mmol/l Good-puffer, pH 6,8, amely 5.000 U/l (Pseudomonasból előállított) CHE-t, 5.000 U/l (Nocardia-ból előállított) CO-t, 0,64 mmol/l HDAOS-t és 1.000.000 U/l (marhamájból előállított) kataláz tartalmaz. 10°C-on tárolja. Ne fagyassza le!

2. Reagens

25 mmol/l Good-puffer, pH 7,0, amely 3,4 mmol/l 4AA-t, POD-t (20.000 U/l torna-peroxidáz) és 0,1% NaN₃-ot tartalmaz 2-10°C-on tárolja. Ne fagyassza le!

A minta

Szérum és plazma használható. A mintákat az analízisig 4°C-on kell tartani (max 7 napig). A mintákat lefagyasztva -70°C-os, vagy annál alacsonyabb hőmérsékleten kell tárolni.

A VIZSGÁLAT KIVITELEZÉSE

Reagens elkészítése

1. és 2. reagens: felhasználásra kész.

Reagens stabilitása

A reagens fénytől védve és 2-8°C-on tárolva felbontás nélkül: a címkén jelzett ideig,
 felbontás után: 30 napig használható.
 kalibrációs gyakoriság: 30 nap
 onboard stabilitás: 30 nap
 A stabilitások kizárólag új rendszerflakon használata esetén érvényesek!

Mérés

Főhullámhossz: 600 nm
 Mellékhullámhossz: 700 nm
 Hőmérséklet: 37°C
 Fényút: 1 cm
 Mérés: végpontos (növekvő)

Bemérés

	reagens vak	standard	minta
deszt. víz	3 µl		
standard		3 µl	
minta			3 µl
R1 reagens	270 µl	270 µl	270 µl

Kevertük össze és a reakcióelegyet inkubáljuk 5 perccig.

R2 reagens	90 µl	90 µl	90 µl
------------	-------	-------	-------

Kevertük össze és inkubáljuk 5 perccig, majd mérjük le a végső abszorbanciaértéket a reagensvakok szemben.

Kalibráció

S1: Desztillált víz

S2: Sentinel HDL/LDL koleszterin kalibrátor vagy

WAKO HDL/LDL koleszterin kalibrátor vagy

Ajánlott új kalibrációt végezni:

- új gyártási számú készlet felbontásakor,

- ahogy ezt a laboratórium belső minőségügyi rendszere előírja.

Az eredmény kiszámítása

$$\frac{A_{minta}}{A_{standard}} \times C_{standard} = C_{minta}$$

A=abszorbancia, C=koncentráció

Belső minőségellenőrzés

A minőségellenőrzés ajánlott minden laboratóriumnak. Két különböző szintű (egy normál és egy emelkedett) kontrollt javasolunk. A kontrollok mért értékeinek a gyártó által meghatározott tartományba kell esniük. Ha a tartományon kívül esnek az értékek, ajánlott

korrigálni a méréseket. Ajánlott kontrollok: Diagnosticum DunaCont N (Katalógusszám: Dcon-N) és DunaCont P (Katalógusszám: Dcon-P)

A REAGENS TELJESÍTMÉNYJELLEMZŐI

A méréseket Hitachi 917-es automatán végeztük (37°C). Átváltás: [mmol/l]=[mg/dl]/38,64

Lineáritási tartomány

A reagens 1-400 mg/dl (0,026-10,3 mmol/l) LDL-koleszterin koncentráció között mér lineárisan. Amennyiben a minta LDL-koleszterin koncentrációja nagyobb, mint 400 mg/dl (10,35 mmol/l), hígítsuk meg fiziológias sóoldattal 1:1 arányban.

Érzékenység

Minden laboratórium számára ajánlott meghatározni saját érzékenységi határt, mivel ezt az alkalmazott spektrofotométer érzékenysége is befolyásolja. A kézi mérés körülményei között 600 nm-en mért 0,001 abszorbanciaaváltozás megegyezik 0,015 mmol/l (0,58 mg/dl) LDL-koleszterin koncentrációval.

Precizitás

	Ismételhetőség (tízszor ismételve)		
	Átlag konc. (mmol/l)	SD	CV %
1. szérum	2,62	0,016	0,61
2. szérum	4,25	0,018	0,43
Reprodukálhatóság			
	Átlag konc. (mmol/l)	SD	CV %
1. szérum	3,26	0,019	0,60
2. szérum	5,84	0,032	0,54

Korreláció

Reagensünket összehasonlítottuk más gyártó LDL-koleszterin reagensével.

Az eredményeket az alábbi táblázat foglalja össze (x= saját reagens, y= más gyártó reagens):

	Szérum	Plazma
Minták száma	60	60
Átlag konc. (mmol/l)	x =3,024 y=3,083	x=2,820 x=2,864
Regresszió	y(mmol/l)= 1,018x+0,0035	y(mmol/l)= 0,98x+0,108
Korrelációs koefficiens	r=0,986	r=0,988

Szelektivitás










Aszkorbinsav 50 mg/dl-ig, szabad bilirubin 50 mg/dl-ig, konjugált bilirubin 40 mg/dl-ig, hemoglobin 500 mg/dl-ig nem befolyásolja a mérést.

Megjegyzés

Ne használjon reagenst a csomagolása címkéjén feltüntetett lejárati dátum eltelté után. A készítményeket, tesztadatokat és reagenset csak az itt leírt teszthez szabad felhasználni. Noha a reagens csak igen kis mennyiségű nátrium-azidot tartalmaznak, kiöntésük után a lefolyókat sok vízzel le kell öblíteni. Csapadék jelenléte a reagensben annak instabilitására utalhat.

Csak in vitro diagnosztikai használatra alkalmas.

A címkéken a következő szimbólumok lehetnek

	In vitro diagnosztikai orvostechnikai eszköz		Gyártási szám
	Gyártó		Kódszám
	CE-jelölés		Tárolási irány
	Tárolási hőmérséklet		Biológiai veszély
	Lejárati idő (év/hónap)		

Irodalom

- Burtis, CA., Ashwood, E.R. (eds.), Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd ed., Saunders, Philadelphia, 1994.
 - Rifai, N., Warnick, GR., Dominiczak, MH. (eds.), Handbook of Lipoprotein Testing. AACC Press, Washington, D.C., USA, 1997.
 - Friedewald, W.T., Levy, R.J., Frederickson, D.S., Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the ultracentrifuge. Clin. Chem. 18, 449-502 (1972).
 - 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).
- Szabó A.: Klinikai laboratóriumi vizsgálatok és paraméterek (2010) (ISBN 978-963-9879-75-1)

Verzió: 77-DL-2015-05

Felülvizsgálat dátuma: 2016-03

A direct immunoinhibition method after selective protection for the quantitative determination of low den-sity lipoprotein cholesterol (LDL-C) in serum and plasma.

When a sample is mixed with Reagent 1, the protecting (masking) reagent binds to LDL and protects LDL from enzyme reactions. Cholesterol esterase (CHE) and cholesterol oxidase (CO) react with non-LDL lipoproteins [chylomicrons (CM), very low density lipoprotein (VLDL) and HDL]. Hydrogen peroxide produced by the enzyme reactions with non-LDL cholesterol is decomposed by catalase in Reagent 1. When Reagent 2 is added, the protecting (masking) reagent is removed from LDL and catalase is inactivated by sodium azide (NaN₃). In this second process, CHE and CO react only with LDL-C. Hydrogen peroxide produced by the enzyme reactions with LDL-C yields a color complex upon oxidative condensation with N-(2-hydroxy-3-sulfofopropyl)-3,5-dimethoxyaniline (HDAOS) and 4-aminoantipyrine (4AA) in the presence of peroxidase (POD). By measuring the absorbance of the blue color complex produced, at approximately 600 nm, the LDL-C concentration in the sample can be calculated when compared with the absorbance of the LDL-C Calibrator.

Reference values

Desirable value:	< 130 mg/dl	< 3.4 mmol/l
Increased risk for coronary heart disease:	130-159 mg/dl	3.36-4.1 mmol/l
High risk for coronary heart disease:	≥160 mg/dl	≥4.13 mmol/l

It is recommended that each laboratory should assign its own normal range.

Reagents

1. Reagent 1 (R1)

25 mmol/l Goods buffer, pH=6,8 containing CHE (5000 U/l from *Pseudomonas*), CO (5000 U/l from *Nocardia*), HDAOS (0.64 mmol/l) and catalase (1000000 U/l from bovine liver). Store at 2-10°C. Do not freeze.

2. Reagent 2 (R2)

25 mmol/l Goods buffer, pH=7.0 containing 4 AA (3.4 mmol/l) POD (20 000 U/l from horseradish) and NaN₃ (0.1%). Store at 2-10°C. Do not freeze.

Sample

Serum or plasma can be used. Store specimen at 4°C before analysis (up to 7 days). For prolonged storage specimens should be stored frozen at -70°C or lower temperature.

PROCEDURE

R1 and R2 are ready for use.

Stability

without opening:	till the expiry date indicated on the label
after opening:	30 days
calibration frequency:	30 days
onboard stability:	30 days

Stability data are valid only when using new system bottle!

Assay conditions

Main wavelength:	600 nm
Sub wavelength:	700 nm
Light path:	1 cm
Temperature:	37°C
Method:	endpoint (increasing)

Pipette into cuvette

	Reagent blank	Standard	Sample
R1	270 µl	270 µl	270 µl
Standard		3 µl	
Sample			3 µl
Distilled water	3 µl		

Mix and incubate for 5 minutes then add:

R2	90 µl	90 µl	90 µl
-----------	-------	-------	-------

Mix and incubate for 5 minutes then read the final absorbance value against reagent blank.

Calibration

S1: Distilled water

S2: HDL/LDL Cholesterol Calibrator (WAKO, Sentinel)

Calibration frequency

Two point calibration is recommended:

- after reagent lot change,
- as required following quality control procedures.

Calculation

$$\frac{A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Standard}}} \times C_{\text{Standard}} = C_{\text{Sample}}$$

A = absorbance
C = concentration

Quality control

A quality control program is recommended for all clinical laboratories. The analysis of control material in both the normal and abnormal ranges with each assay is recommended for monitoring the performance of the procedure. Each laboratory should establish corrective measures to be taken if values fall outside the limits. Recommended controls: Diagnosticum DunaCont N (Cat. No.: Dcon-N) and DunaCont P (Cat. No.: Dcon-P)

PERFORMANCES DATA

The following data were obtained using the Hitachi 917 analyzer (37°C). Conversion factor: [mmol/l]=[mg/dl]/38,64

Linearity

The test is linear up to 400 mg/dl (10.35 mmol/l). If the LDL-C value exceeds 400 mg/dl (10.35 mmol/l), dilute the sample with physiological saline solution in ratio of 1:1 repeat the assay, and multiply the result by 2.

Sensitivity

It is recommended that each laboratory establishes its own range of sensitivity as this is limited by the sensitivity of the spectrophotometer used. Under manual conditions however, a change of 0.001 Abs is equivalent to 0.015 mmol/l (0.58 mg/dl) LDL-cholesterol concentration at 600 nm.

Precision

	Repeatability (Number of replicates n=10)		
	Average conc. (mmol/l)	SD	CV%
Serum I.	2.62	0.016	0.61
Serum II.	4.25	0.018	0.43

	Reproducibility		
	Average conc. (mmol/l)	SD	CV%
Serum I.	3.26	0.019	0.60
Serum II.	5.84	0.032	0.54

Correlation

Comparative studies were done to compare our reagent with another LDL-C L-Type assay made by other manufacturer on 60 human serum and plasma samples. The results from these studies are detailed below.

	Serum	Plasma
# of samples	60	60
Average conc. (mmol/l)	x = 3,024 y = 3,083	x = 2,820 x = 2,864
Regression analysis	y(mmol/l) = 1,018x + 0,0035	y(mmol/l) = 0,98x + 0,108
Correlation coefficient	r = 0,986	r = 0,988

Selectivity










Ascorbic acid 50 mg/dl, free bilirubin 50 mg/dl, conjugated bilirubin 40 mg/dl and hemoglobin 500mg/dl don't interfere with the assay up to the given levels.

Note

Do not use reagents after the expiry date stated on each reagent container label. Do not use products, test solutions and reagents described above for any purpose other than described herein. Even though these reagents contain only minute quantities of sodium azide, drains should be flushed well with a large amount of water when discarding the solution. The presence of any sediment in the reagent may indicate its instability.

For in vitro diagnostic use only!

The following symbols can be used on the labels

	In vitro diagnostic device		Batch code
	Manufacturer		Catalogue number
	CE-marking		This way up
	Temperature limitations		Biological risk
	Use by (year/month)		

Bibliography

- Burtis, CA., Ashwood, E.R. (eds.), *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 2nd ed., Saunders, Philadelphia, 1994.
- Rifai, N., Warnick, GR., Dominiczak, M.H. (eds.), *Handbook of Lipoprotein Testing*. AACC Press, Washington, D.C., USA, 1997.
- Friedewald, W.T., Levy, R.I., Frederickson, D.S., *Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the ultracentrifuge*. *Clin. Chem.* 18,449-502 (1972).
- 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).
- Szabó A.: *Klinikai laboratóriumi vizsgálatok és paraméterek (2010)* (ISBN 978-963-9879-75-1)

Version: 77-DL-2015-05
Date of revision: 2016-03