

Lipoprint®

LDL Subfractions Kit



REF 48-7002

IVD

CE

EC REP

MDSS
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Quantimetrix Corporation
2005 Manhattan Beach Blvd.
Redondo Beach, CA 90278
+1.310.536.0006

Deutsch

INDIKATIONEN UND VERWENDUNGSZWECK

Der LDL Subfraktionen-Kit „Lipoprint LDL Kit“ aus dem Quantimetrix Lipoprint-System ist ein Instrument zur Messung von Lipoprotein-Cholesterin (für Lipoproteinfraktionen und Subfraktionen von VLDL bis HDL) in Nüchternserum oder -plasma mit einer Cholesterin-Gesamtkonzentration von >100 mg/dl. Lipoprotein-Cholesterinmessungen unterstützen die Evaluierung von Lipid-Stoffwechselstörungen, wenn sie zusammen mit anderen Lipid-Tests, Patientenrisikoeinschätzungen und klinischen Bewertungen verwendet werden.

ZUSAMMENFASSENDE ERKLÄRUNG DES TESTS

Plasmalipoproteine sind sphärische Partikel, die für den Transport von Cholesterin, Triglyceriden und Phospholipiden zuständig sind. Man unterscheidet fünf große Lipoproteinklassen: Chylomicronen, Lipoprotein von äußerst niedriger Dichte (VLDL), Lipoprotein mittlerer Dichte (IDL), Lipoprotein niedriger Dichte (LDL) sowie Lipoprotein hoher Dichte (HDL). Erniedrigtes HDL-Cholesterin ist ein starker Indikator für Herzkrankheiten (KHK) [1]. Erhöhte LDL-Cholesterolverte (LDL-C) wurden als einer der wichtigsten Risikofaktoren für KHK identifiziert [2]. Es ist bekannt, dass die Lipoproteinklassen heterogen sind und aus mehreren Subfraktionen bestehen, die sich hinsichtlich Partikelgröße, Dichte und chemischer Zusammensetzung unterscheiden. Die Heterogenität der Lipoproteine wurde durch verschiedene Analysemethoden wie Density Gradient Ultracentrifugation [3], Nuclear Magnetic Resonance (NMR) [4], Non-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (GGE) [5] und dem Lipoprint-System, einem linearen, Polyacrylamid-Gel-Elektrophoresesystem [6] bewiesen.

LDL kann mit dem Lipoprint-System in maximal sieben LDL-Subfraktionen getrennt werden. Die LDL-Subfraktionen wurden von LDL-1, das aus den größten Partikeln besteht, bis LDL-7, das die kleinsten Partikel enthält, benannt.

Genetische sowie Umweltfaktoren sind dafür verantwortlich, dass bei Personen unterschiedliche LDL-Heterogenitätsgrade auftreten. Alter, Geschlecht und Lipidzustand sind bekannte Faktoren, welche das LDL Subfraktionsprofil beeinflussen [7]. Individuen mit Lipoproteinprofilen, die vor allem aus den größeren, LDL-1- und LDL-2-Subfraktionen bestehen, wurden unter **Pattern A** subsummiert, Profile mit vorherrschend kleineren und dichteren Subfraktionen (LDL-3 bis LDL-7) wurden als **Pattern B** zusammengefasst [5]. (Abb. 1)

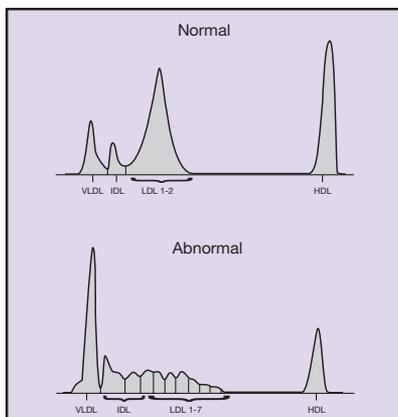


Abbildung 1. Normale (Pattern A) und abnormale (Pattern B) Lipoproteinprofile

In einer Studie an 109 Patienten mit Myokardinfarkt (MI) zeigten Austin et al. [5], dass die LDL-Subfraktion Pattern B, unabhängig von Geschlecht, Alter und relativem Gewicht ein dreifach höheres MI-Risiko aufwies. Krauss [8] kam zu ähnlichen Ergebnissen. Rajman et al. [6] berichtete ebenfalls von dem mit Lipoprotein-Subfraktionen niedriger Dichte in Zusammenhang stehenden Risikofaktor bei Männern mit normalen Triglyceridwerten.

TESTPRINZIP

Der Lipoprint LDL-Kit besteht aus folgenden Komponenten:

- Vorgefertigtes lineares Polyacrylamidgel (Stapelgel und Separationsgel) in einem Glasrohr (Abb. 2)
- Flüssiges Ladegel mit lipophiler Färbung
- Puffersalze

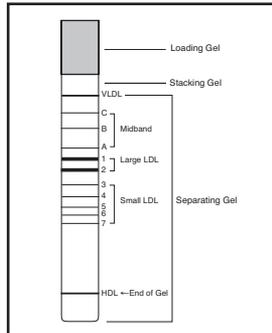


Abbildung 2. Schemadarstellung des Lipoprint-Gelröhrchens

Der Farbstoff ist proportional zum relativen Cholesteringehalt in jedem Lipoprotein gebunden [9]. Die vorgefärbten Lipoproteine werden nacheinander einer Elektrophorese unterzogen. In der ersten Elektrophoresephase werden die Lipoproteinpartikel durch Lade- und Stapelgels zu einem scharfen engen Band konzentriert. Während die Lipoproteinpartikel durch die Matrix des Separationsgels wandern, werden sie, je nach Partikelgröße von den größten zu den kleinsten, durch die siebende Wirkung des Gels zu Lipoproteinbändern aufgetrennt: HDL wandert am weitesten, gefolgt von kleinem und dichtem LDL, größerem LDL, Bändern mittlerer Dichte (hauptsächlich aus IDL) sowie VLDL. Gegebenenfalls tauchen auf dem Stapelgel Chylomikrone auf, oder sie verbleiben im Ladegel.

Ein typisches Lipoprint-Profil besteht aus 1 VLDL-Band, 3 Bändern mittlerer Dichte, bis zu 7 LDL-Bändern und 1 HDL Band. Nach Beendigung der Elektrophorese werden die verschiedenen in der Probe vorhandenen gefärbten Lipoproteinfraktionen (Bänder) nach ihrer Mobilität (R_f) identifiziert; dazu wird der VLDL-Wert als Startreferenzpunkt festgelegt (VLDL = 0) und der HDL-Wert als führender Referenzpunkt (HDL = 1) festgelegt. (Abb.3)

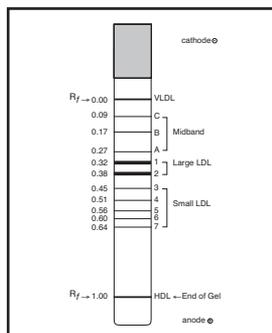


Abbildung 3. Mobilität der Lipoproteinbänder

Der relative Bereich jedes Lipoproteinbands wird bestimmt und mit der Cholesterin-Gesamtkonzentration der Probe multipliziert; das Ergebnis ist der Cholesteringehalt jedes Bands in mg/dl. Die Cholesterin-Gesamtkonzentration der Probe muss unabhängig gemessen werden, d. h. mit einem klinischen Analysegerät oder einem entsprechenden medizinischen Instrument.

PRODUKTBESCHREIBUNG

Der Lipoprint LDL-Kit besteht aus vorgefertigten, hochauflösenden, Polyacrylamidgelröhrchen, einer Ladegellösung, die lipophilen Farbstoff enthält sowie den Puffersalzen.

Mittelgelieferte Reagenzien und Materialien (siehe Quantimetrix Katalognr. 48-7002)

Ein Testkit 100 besteht aus:

1. Lipoprint LDL-Gelröhrchen 100 Röhrchen
Polyacrylamid, Puffer, Konservierungsmittel
2. Lipoprint LDL-Ladegel 24 ml
Acrylamid
N, N-methylenebisacrylamid
Lipophiler Farbstoff
Katalysator
Stabilisator
Puffer
3. Lipoprint LDL-Puffersalze 6 Fläschchen
Tris (Hydroxymethyl) Aminomethan
Borsäure
4. Lipoprint LDL-Produktbeilage je 1

Lipoprint System (nicht im Lieferumfang enthalten, siehe Quantimetrix Katalognr. 48-9150/9152)

1. Computer (incl. LipoWare-Analyseprogramm)
2. Farbdrucker
3. Digitalscanner
4. Elektrophoresekammer
5. Netzteil (120 V/220 V)
6. Vorbereitungs-Rack
7. Vorbereitungs-lampe
8. Abzieher

Lipasure – Lipoproteinkontrolle (nicht im Lieferumfang enthalten, siehe Quantimetrix Katalognr. 48-7060 – Level 1)

Erforderliche Materialien (nicht im Lieferumfang enthalten)

1. Destilliertes oder deionisiertes Wasser
2. 25 µl Automatischer Pipettor
3. 200 µl Automatischer Pipettor
4. Magnetrührstab
5. Parafilm™
6. Messzylinder

Wiederherstellung der Reagenzien

Die Elektrolytpufferlösung wird durch Auflösen eines Fläschchens mit Puffersalzen des Lipoprint LDL-Kits in 1200 ml destilliertem oder deionisiertem Wasser wiederhergestellt.

Lagerung und Stabilität

Gelröhrchen, Ladegel und Puffersalze sollten bei 2–8 C gelagert werden. **Nicht einfrieren.** Bei geeigneten Lagerbedingungen sind die Reagenzien geöffnet oder ungeöffnet bis zum angegebenen Verfallsdatum stabil.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Nur für die *In-Vitro*-Diagnostik

- Den Lipoprint LDL-Kit nur gemäß der Anweisungen in der Lipoprint-Packungsbeilage verwenden.
- Die Ladegellösung enthält Acrylamid, das bei Hautkontakt oder Verschlucken toxisch wirkt. Einatmen und längere Exposition des Ladegels vermeiden.
- Das Ladegel ist lichtempfindlich und wird in einer braunen Glasflasche geliefert.
- Pipettieren mit dem Mund und jeglichen physischen Kontakt mit Reagenzien oder Proben vermeiden.
- Sämtliche Proben, Reagenzien und Kontrollen sollten bei Verschlucken oder Absorption nach längerem Hautkontakt als potentiell infektiös behandelt werden. Bei der Handhabung und Entsorgung der Materialien sind stets entsprechende Vorsichtsmaßnahmen einzuhalten.

PROBEN UND PROBENNAHME

- Es sollten nur Nüchternproben (12 Stunden) verwendet werden.
- Es kann Serum oder EDTA-Plasma verwendet werden (siehe S. 15).
- Kein Heparin als Antikoagulans verwenden.
- Die Proben können bis zu 7 Tage bei 2–8 C aufbewahrt werden.
- Ein Einfrieren der Proben wird nicht empfohlen. Für den Fall, dass eine Probe doch eingefroren werden muss, sollte sie kryogen eingefroren werden (–70 C oder kälter).

ASSAY-VERFAHREN

1. Die Elektrolytpufferlösung vorbereiten, indem wie beschrieben ein Fläschchen Puffersalze in 1200 ml deionisiertem/destilliertem Wasser aufgelöst werden.
2. Die Gelröhrchen aus dem Behälter nehmen, abwischen und im Vorbereitungs-Rack mit dem ungefüllten Ende nach oben platzieren. (Abb. 4) Dabei ein Berühren der Enden des Gelröhrchens oder Druck auf das Gel vermeiden, da sonst Luftblasen in das Gel eindringen könnten. Das Gelröhrchen nicht verwenden, wenn innen Luftblasen sichtbar sind oder Gel austritt.
3. Den durch Lagerung an der Oberseite angesammelten Puffer durch Schütteln des Racks vollständig vom Gel entfernen. Gegebenenfalls das Ende des Röhrchens blotten, während die Röhrchen umgekehrt fixiert sind, um überschüssigen Puffer aus dem Innern des Röhrchens zu entfernen.
4. In jedes Röhrchen 25 µl Probenmaterial geben. (Abb. 4)



Abbildung 4. Probenapplikation

- 200 µl Lipoprint-Ladegel in jedes Röhrchen hinzugeben.
- Einen Streifen Parafilm zwischen Gelröhrchen und der Abdeckung des Vorbereitungs-Racks platzieren, um Kontamination zu vermeiden. Das Ladegel durch mehrmaliges Umdrehen des Vorbereitungs-Racks mit der Probe vermischen. (Abb. 5)

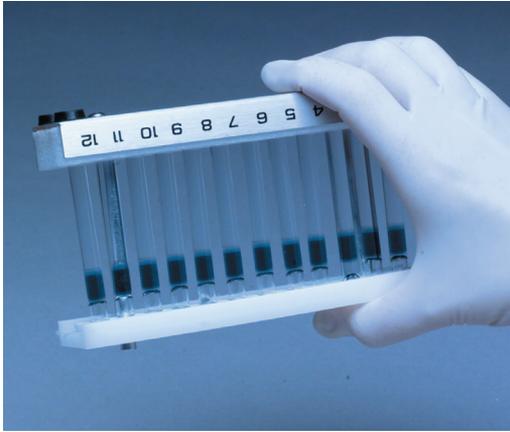


Abbildung 5. Mischen von Ladegel und Proben

- Den Vorbereitungslichtstab mit der Glühbirne nach oben platzieren. Das beladene Vorbereitungs-Rack so platzieren, dass das Ladegel die Glühbirne berührt. (Abb. 6)
Die Ladegels 30 Minuten (jedoch nicht mehr als 40 Minuten) photopolymerisieren.



Abbildung 6. Photopolymerisation

- Nach Beendigung der Photopolymerisation alle Gelröhrchen aus dem Vorbereitungs-Rack entnehmen und vorsichtig in den Silikonadapter der oberen Kammer einsetzen. Während das Gelröhrchen an der Seite gehalten wird, das Röhrchen nach oben schieben, bis das Röhrchenende mit dem Ladegel mit der Oberkante des Adapters bündig ist. Das Einsetzen ist leichter, wenn die Oberseite des Gelröhrchens nass ist. Bei diesem Schritt die Enden des Röhrchens nicht berühren. Wenn die Kammer nicht vollständig gefüllt ist, die für diesen Zweck mitgelieferten leeren Adapter mit kleinen Glasröhrchen einsetzen. Die Röhrchen von oben eindrücken, bis sie mit der Unterseite des Adapters bündig sind. (Abb. 7)

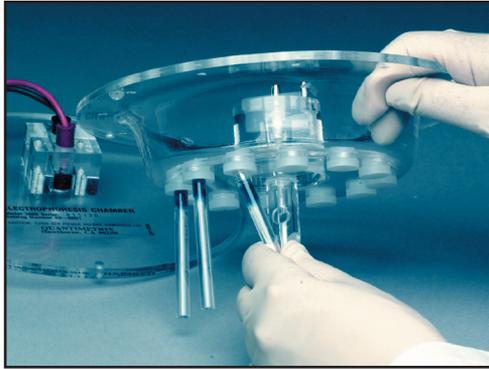


Abbildung 7. Laden der Röhrenchen

9. 1000 ml Elektrolytpufferlösung in der unteren und 200 ml in der oberen Kammer platzieren. Der untere Puffer kann bis zu fünf Mal wiederverwendet werden. **Für die obere Kammer nur frischen Puffer verwenden.** Der Puffer muss Raumtemperatur haben (RT: 18–27 C).
10. Nachdem beide Kammern montiert und mit Puffer gefüllt sind, jedes Röhrenchen gründlich auf Luftblasen untersuchen. Sämtliche Luftblasen mit einer Pipettorspitze entfernen. Luftblasen könnten den elektrischen Stromfluss unterbrechen.
11. Die Abdeckung der Elektrophoresekammer positionieren und an die Stromversorgung anschließen. (Abb. 8) Die Stromversorgung so einstellen, dass für jedes **Gelröhrenchen 3 mA abgegeben wird** (z. B. 36 mA für 12 Röhrenchen, 18 mA für 6 Röhrenchen etc.). Die Spannung sollte auf maximale Leistung eingestellt sein (500 V).



Abbildung 8. Zusammengesetzte Kammer

12. Die Elektrophoresedauer beträgt ca. 60 Minuten. Die Elektrophorese anhalten, wenn die HDL-Fraktion ca. 1 cm vom Boden des am schnellsten wandernden Gelröhrenchens entfernt ist.
13. Nach Beendigung der Elektrophorese die Stromversorgung ausschalten, den Kammerdeckel öffnen und den Elektrolytpuffer in der oberen Kammer entsorgen. Der untere Puffer kann zurückgehalten und bis zu fünf Mal wiederverwendet werden. Nach 7 Tagen entsorgen.
14. Bevor die Gelröhrenchen aus der Elektrophoresekammer entnommen werden, überschüssigen Puffer abwischen, anschließend für die Übertragung in den Scanner zur Analyse im Vorbereitungs-Rack platzieren. Lassen Sie die Röhrenchen mit dem Gel mindestens 30 Minuten, bzw. höchstens 2 Stunden vor dem Scannen ruhen.

Anmerkung zum Verfahren: Während der Elektrophorese kann eine Verzerrung der Oberfläche des Separationsgels und des VLDL-Bands auftreten. Die Verzerrung kann beim Entfernen der Gels aus der Elektrophoresekammer korrigiert werden, indem der Abzieher vorsichtig von der Oberseite des Ladegels aus neben dem Glas eingeführt wird. Die Oberfläche des Separationsgels mit kreisförmigen Bewegungen rühren. Das Gel nimmt wieder seine normale Form an. Das Ladegel beim Herausziehen des Tools möglichst nicht verschieben (sollte sich das Gel verschieben, die Leerräume mit deionisiertem/destilliertem Wasser füllen).

QUALITÄTSKONTROLLE

Die Zuverlässigkeit der Testergebnisse sollte regelmäßig mit Kontrollmaterialien geprüft werden, welche die Eigenschaften der Patientenproben auf angemessene Weise emulieren. Für jeden Lauf mit Patientenproben wird die Verwendung von Qualitätskontrollen empfohlen. Die Kontrollmaterialien sind nur zur Überprüfung der Präzision bestimmt. Ein Kriterium für die Validierung der Assay-Leistung sollte die Wiederherstellung der Kontrollwerte innerhalb der entsprechenden Bereiche sein.

Qualitätskontrollen sollten gemäß der lokalen und staatlichen Vorschriften oder Akkreditierungsanforderungen durchgeführt werden. Entsprechende Materialien für die Qualitätskontrolle, Liposure, sind von Quantimetrix Corporation erhältlich.

QUALITATIVE ERGEBNISSE

Hinweis: Die verschiedenen Bänder eines Lipoprint-Profiles können anhand der Lipoprint-Schablone für eine qualitative Bewertung (homogene LDL-Distribution vs. heterogene Distribution) identifiziert werden.

Das Lipoproteinprofil zeigt den Zustand der Patientenprobe an. (Abb. 9) Ein normales Lipoproteinprofil (Pattern A) zeigt typischerweise Bänder für VLDL; Mittlere Bänder-C, B und A (diese enthalten IDL); LDL-1 und 2 sowie HDL. Das Vorhandensein von weiteren LDL-Subfraktionen (LDL-3 bis 7) ist ein Indikator für heterogenes LDL (Pattern B).

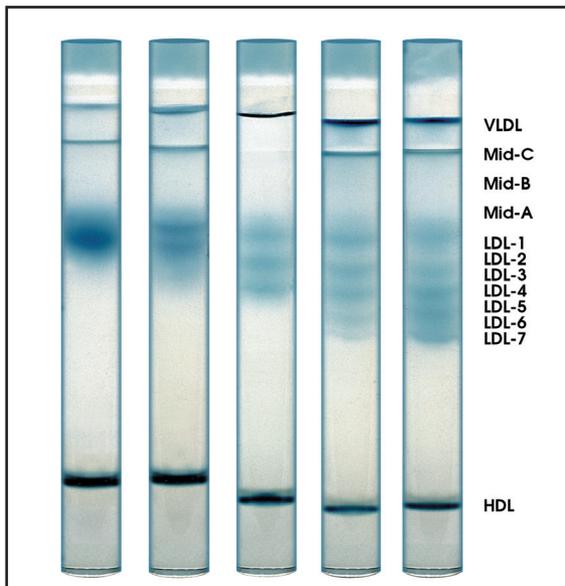


Abbildung 9. Distribution der Lipoprotein-Subfraktionen bei fünf Individuen – von einem homogenen LDL-Muster links, bis zu einem fortschreitend heterogenen Muster auf der rechten Seite.

Verwendung der Lipoprint-Schablone

Die Schablone des Lipoprint LDL-Systems wird zur Identifizierung der auf dem Gel vorhandenen Lipoprotein-Subfraktionen verwendet. (Abb. 10)

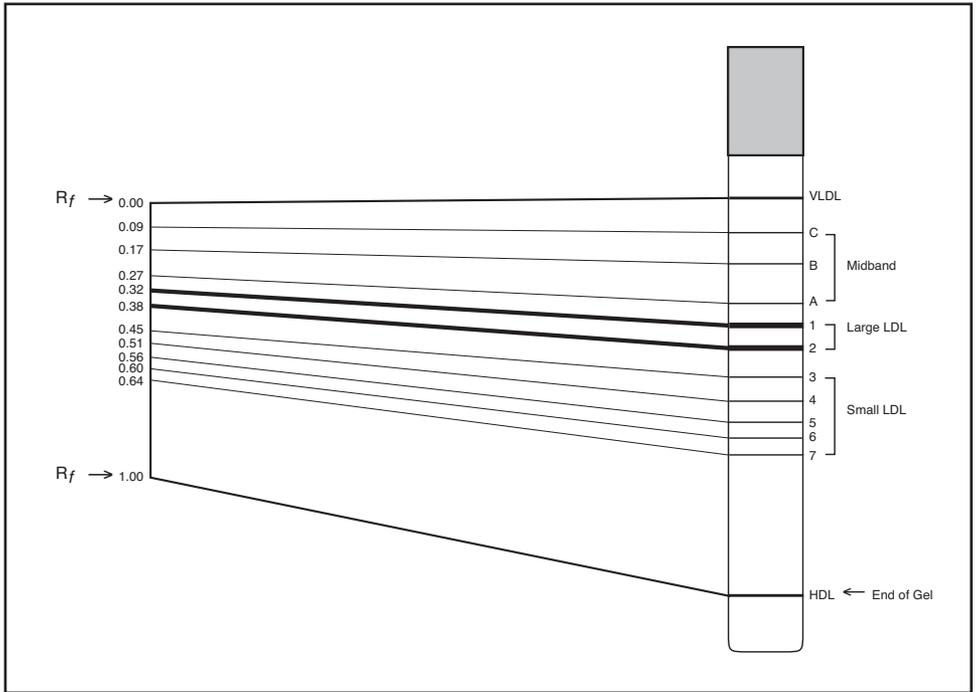


Abbildung 10. LDL-Subfraktionsschablone für das Lipoprint-System

1. Die Mitte jedes vorhandenen Lipoproteinbands mit einem Marker auf dem Glasrohr markieren.
2. Die VLDL-Fraktion an der Oberseite des Separationsgels auf die Markierungslinie „VLDL“ auf der Schablone ausrichten.
3. Das Gel an der Schablone entlang schieben, bis das HDL-Band über der mit „HDL“ markierten Linie liegt.
4. Die in der Probe vorhandenen Lipoprotein-Subfraktionen bestimmen, indem die Bänder auf dem Gel mit den entsprechenden Linien auf der Schablone abgeglichen werden.

QUANTITATIVE ERGEBNISSE

Hinweis: Bevor quantitative Ergebnisse generiert werden, muss ein Cholesterin-Gesamtwert für jede zu analysierende Probe mithilfe einer klinisch anerkannten Methode ermittelt werden. **Die Cholesterin-Gesamtkonzentration der Probe muss >100 mg/dl betragen.**

Die Gelröhrchen werden gescannt und die relative Fläche jeder Lipoprotein-Subfraktion wird durch vertikale Linien an den vorgegebenen Cut-off-Bereichen für jedes Band ermittelt. Die in jedem Lipoproteinband vorhandene Menge an Cholesterin wird durch Multiplikation der jeweiligen Fläche eines jeden Bands mit dem Cholesterin-Gesamtwert der Probe berechnet. Der LDL-Cholesterinwert wird als Summe der Cholesterin-Konzentrationen aller LDL-Subfraktionen, plus den Mittelbändern A, B und C ermittelt.

Lipoprotein-Subfraktionsprofile werden üblicherweise nach Typ A (normal) und Typ B (abnormal) anhand der durchschnittlichen Größe der LDL-Partikel [5] klassifiziert. Ein normales Lipoprint-Profil mit vorwiegend großen LDL (LDL-1 und LDL-2) entspricht Typ A. (Abb. 11)

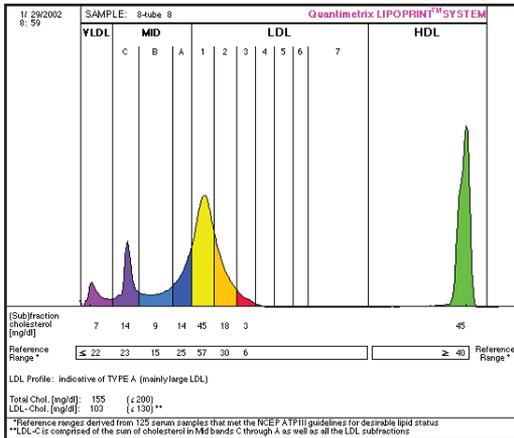


Abbildung 11. Typisches normales Lipoprint-Profil

Ein abnormales Lipoprint-Profil mit vorwiegend kleinem LDL (LDL-3 bis LDL-7) entspricht Typ B, wie in der Literatur beschrieben. (Abb. 12)

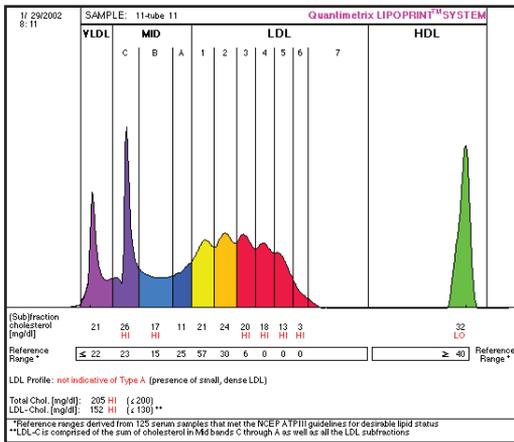


Abbildung 12. Typisches abnormales Lipoprint-Profil

EINSCHRÄNKUNGEN

- Der Lipoprint LDL-Test sollte zusammen mit anderen Daten (z. B. weiteren klinischen Tests, Beobachtungen des Arztes, Familiengeschichte etc.) verwendet werden.
- Heparin unterbindet die Separation der LDL-Subfraktionen.
- Der Cholesterin-Gesamtgehalt in der Probe muss mehr als 100 mg/dl betragen, um eine zu hohe Einschätzung des VLDL-Cholesterols zu vermeiden.
- Durch Chylomikrone in der Probe wird die Messung der Cholesterin-Subfraktion ungültig. Das Aussehen der Probe (Trübung, Turbidität oder eine cremige Schicht an der Probenoberfläche) nach dem Einfrieren übernacht sollte als Bestätigung für das Vorhandensein von Chylomikronen gewertet werden.
- Die Lipoprint-Ergebnisse wurden nicht durch Lipoprotein-Tests an Schwangeren geprüft.
- Die NCEP hat keine Richtlinien bezüglich optimaler/wünschenswerter Werte für LDL-Subfraktionen veröffentlicht.

ERWARTETE WERTE

HDL-C und LDL-C

Das National Cholesterol Education Program (NCEP) hat Risiko-relevante Cut-off-Punkte für LDL-Cholesterol und HDL-Cholesterol aufgestellt, die im Mai 2001 durch den dritten Bericht zum NCEP Adult Treatment Panel (ATP III) bestätigt wurden [10]:

Fraktion	Bereich	Zustand
HDL-C	≥ 40 mg/dl	Vermindertes Risiko bei höheren Konzentrationen
	< 40 mg/dl	Erhöhtes Risiko
LDL-C	≤ 100 mg/dl	Optimal für Patienten mit Koronarherzkrankheit (KHK)
	< 130 mg/dl	Wünschenswert
	130 - 159 mg/dl	Leicht erhöhtes Risiko
	≥ 160 mg/dl	Hohes Risiko

LDL-C beinhaltet alle Lipoproteinpartikel mit $d > 1,006$ to $1,063$ kg/l, wie VLDL Reste, IDL, Lp(a) und LDL [2]. Diese Partikel entsprechen der Summe der Mittleren Bänder und LDL Subfraktionen, die durch das Lipoprint-System gelöst werden können.

Subfraktion Cholesterin

Die zu erwartenden normalen Werte für die einzelnen Subfraktionen im Lipoprint-System wurden wie folgt ermittelt: Es wurden nach eigenen Angaben gesunde Individuen, N = 273 (Altersgruppe 18 bis 85 Jahre, 166 Frauen und 107 Männer, 47 % kaukasisch, 18 % spanisch, 16 % asiatisch, 5 % schwarz und 14 % ohne Angaben) rekrutiert. Die Freiwilligen mussten 12 Stunden fasten. Ganzkörperblut wurde durch Venenpunktur in ein Serumröhrchen überführt. Anschließend wurden die Serumproben auf die angegebenen Lipid-Parameter getestet und mit dem Lipoprint LDL-System Lipoproteinprofile erstellt.

Ausschlusskriterien waren u. a. Diabetiker, Individuen, die Lipidsenkungsmedikamente einnahmen sowie solche mit kürzlich aufgetretenen Herzattacken. Außerdem waren schwangere Frauen wegen ihres veränderten Lipidzustands ausgeschlossen [12].

Zur Bestimmung der zu erwartenden Werte wurden nur solche Proben zugelassen, die den NCEP-Richtlinien (ATP III) für wünschenswerte Lipidwerte [10] entsprachen, d. h. TC < 200 mg/dl, LDL < 130 mg/dl, HDL > 40 mg/dl und Triglyceride < 150 mg/dl. Mithilfe der normalen Proben, N = 114 (Altersgruppe 18 bis 84 Jahre, 32 % Männer und 68 % Frauen) wurden normale Werte ermittelt, definiert als 95 %-iges Konfidenzintervall (im Durchschnitt ± 2 SD) für jeden Lipid-Parameter, wie er mit dem Lipoprint LDL-System ermittelt wurde. (Tabelle1)

Tabelle 1. Normale Population

	VLDL (mg/dl)	Mittelband Cholesterin			LDL Subfraktion Cholesterin			LDL Gesamt (mg/dl)	HDL (mg/dl)	TC (mg/dl)
		Mittel-C (mg/dl)	Mittel-B (mg/dl)	Mittel-A (mg/dl)	LDL-1 (mg/dl)	LDL-2 (mg/dl)	LDL-3 (mg/dl)			
Wertebereich	6 - 26	9 - 24	5 - 17	6 - 26	24 - 59	4 - 32	0 - 4	59 - 128	40 - 103	123 - 199
Durchschnitt	12,9	16,5	10,1	16,6	41,1	14,3	1,9	95,7	56,8	168,1
SA	4,12	2,82	2,40	4,26	7,85	6,82	0,81	16,56	11,29	18,45
95% Wertebereich	4,7 - 22,1	10,9 - 22,1	5,3 - 14,9	8,1 - 25,1	25,4 - 56,8	0,7 - 28,6	0 - 3,6	62,5 - 128,8	40,0 - 79,4	131,2 - 200,0
N*	114	114	114	114	114	114	44	114	114	114

* Zahl der Proben mit den jeweiligen Fraktionen.

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen normalen Wertebereich ermittelt, der je nach geographischen, Patienten- und Umweltbedingungen unterschiedlich ausfallen kann.

Daten für die Population außerhalb der NCEP-Gruppe, N = 141 (Altersgruppe 18 bis 77 Jahre, 46 % Männer und 54 % Frauen) enthält Tabelle 2.

Tabelle 2. Population außerhalb der NCEP-Richtlinien

	VLDL (mg/dl)	Mittelband-Cholesterin			LDL-Subfraktion-Cholesterin					LDL Gesamt (mg/dl)	HDL (mg/dl)	TC (mg/dl)
		Mittel-C (mg/dl)	Mittel-B (mg/dl)	Mittel-A (mg/dl)	LDL-1 (mg/dl)	LDL-2 (mg/dl)	LDL-3 (mg/dl)	LDL-4 (mg/dl)	LDL-5 (mg/dl)			
Wertebereich	5 - 69	9 - 40	5 - 37	5 - 34	9 - 77	7 - 55	0 - 35	0 - 28	0 - 11	58 - 215	26 - 137	104 - 319
Durchschnitt	24,4	23,2	14,6	18,6	46,5	31,5	9,2	4,7	5,5	134,8	54,2	219,4
SA	13,50	5,65	5,21	6,14	15,13	10,98	7,50	6,05	3,6	27,17	18,05	35,04
95% Wertebereich	0 - 51,4	12,0 - 34,7	4,2 - 25,0	6,4 - 30,9	16,2 - 76,8	9,5 - 53,5	0 - 24,2	0 - 16,8	0 - 16,8	80,5 - 189,1	18,2 - 90,2	148,6 - 290,2
N*	141	141	141	141	141	141	115	44	8	141	141	141

* Anzahl der Proben mit den jeweiligen Fraktionen.

BESONDERE LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

Präzision

Vier Proben wurden auf Abweichungen innerhalb eines Assays und zwischen verschiedenen Assays getestet. Es wurden Proben mit mittlerer und hoher HDL-C und LDL-C ausgewählt:

Probe 1: niedrige LDL-C, hohe HDL-C Konzentration und homogenes LDL-Muster (nur LDL-1 und 2)

Probe 2: mittleres LDL-C, mittlere HDL-C Konzentration und leicht dispergierendes LDL-Muster (LDL-1, 2, 3)

Probe 3: hohes LDL, niedrige HDL Konzentration und dispergierendes LDL-Muster (LDL-1, 2, 3 und 4)

Probe 4: hohes LDL-C, mittlere HDL-C Konzentration und dispergierendes LDL-Muster (LDL-1 bis 7)

Präzision innerhalb eines Assays

Proben wurden in Replikaten von 12 (der maximalen Kapazität der Elektrophoresekammer) getestet. Die Ergebnisse für HDL-C, LDL-C (Summe der Mittelbänder C, B, A und LDL-Subfraktionen) sowie VLDL-C sind in Tabelle 3 enthalten.

Tabelle 3. Daten zur Präzision innerhalb eines Assays für **HDL, LDL** und **VLDL**

Probe	N	HDL-C Durchschnitt (mg/dl)	SA	CV (%)	LDL-C Durchschnitt (mg/dl)	SA	CV (%)	VLDL-C Durchschnitt (mg/dl)	SA	CV (%)
1	12	55	1,47	2,68	86	0,90	1,05	17	0,99	5,86
2	12	42	0,78	1,87	120	1,43	1,20	15	0,99	6,43
3	12	31	0,90	2,87	133	2,02	1,52	35	1,97	5,58
4	12	48	1,37	2,84	180	2,02	1,12	23	1,66	7,28

Daten zur Präzision für Mittelbänder C, B, A und LDL Subfraktionen 1–7 sind in Tabellen 4 und 5 aufgeführt.

Tabelle 4. Daten zur Präzision innerhalb eines Assays für **MITTELBAND**-Subfraktionen

Probe	N	Mid-C Durchschnitt (mg/dl)	SA	CV (%)	Mid-B Durchschnitt (mg/dl)	SA	CV (%)	Mid-A Durchschnitt (mg/dl)	SA	CV (%)
1	12	16	0,76	4,75	9	0,60	6,67	14	1,56	11,14
2	12	17	1,44	8,47	13	0,51	3,92	14	0,72	5,14
3	12	22	1,21	5,50	16	0,47	2,94	13	0,50	3,85
4	12	30	1,44	4,80	15	1,36	9,07	10	0,77	7,70

Tabelle 5. Daten zur Präzision innerhalb eines Assays für **LDL**-Subfraktionen

Probe	N	LDL-1 Durchschnitt (mg/dl)	SA	CV (%)	LDL-2 Durchschnitt (mg/dl)	SA	CV (%)	LDL-3 Durchschnitt (mg/dl)	SA	CV (%)	LDL-4 Durchschnitt (mg/dl)	SA	CV (%)
1	12	36	0,60	1,67	10	1,68	16,80	N/A	-	-	N/A	-	-
2	12	28	0,91	3,25	32	0,70	2,19	14	1,65	11,79	N/A	-	-
3	12	21	0,51	2,43	19	0,88	4,63	18	0,38	2,11	19	0,86	4,53
4	12	24	0,86	3,58	22	0,80	3,64	17	0,28	1,65	20	0,49	2,45

Probe	N	LDL-5 Durchschnitt (mg/dl)	SA	CV (%)	LDL-6 Durchschnitt (mg/dl)	SA	CV (%)	LDL-7 Durchschnitt (mg/dl)	SA	CV (%)
1	12	N/A	-	-	N/A	-	-	N/A	-	-
2	12	N/A	-	-	N/A	-	-	N/A	-	-
3	12	N/A	-	-	N/A	-	-	N/A	-	-
4	12	24	0,41	1,72	16	0,72	4,62	4	0,68	17,89

Genauigkeit zwischen verschiedenen Assays

Es wurden vier Proben zweifach getestet, 5 Tage lang zweimal pro Tag, in 4 Elektrophoresekammern; dazu wurde eine einzelne Charge von Gelröhrchen verwendet. Die entsprechenden Ergebnisse zur Präzision zwischen verschiedenen Assays sind in Tabellen 6–8 aufgeführt.

Tabelle 6. Daten zur Präzision zwischen verschiedenen Assays für **HDL**, **LDL** und **VLDL**

Probe	N	HDL-C Durchschnitt (mg/dl)	SA	CV (%)	LDL-C Durchschnitt (mg/dl)	SA	CV (%)	VLDL-C Durchschnitt (mg/dl)	SA	CV (%)
1	80	60	1,49	2,49	94	1,41	1,50	10	0,90	9,40
2	80	46	1,45	3,15	137	1,73	1,26	11	0,91	8,27
3	80	32	1,52	4,75	160	2,03	1,27	33	2,35	7,12
4	80	50	2,32	4,69	178	2,79	1,57	23	1,97	8,57

Tabelle 7. Daten zur Präzision zwischen verschiedenen Assays für **MITTELBAND**-Subfraktionen

Probe	N	Mid-C Durchschnitt (mg/dl)	SA	CV (%)	Mid-B Durchschnitt (mg/dl)	SA	CV (%)	Mid-A Durchschnitt (mg/dl)	SA	CV (%)
1	80	14	1,23	8,79	10	0,87	8,27	19	2,00	10,90
2	80	18	1,99	11,06	13	0,86	6,62	16	1,33	8,31
3	80	21	2,84	13,63	22	1,04	4,73	17	1,27	7,47
4	80	28	1,87	7,79	13	0,91	7,00	10	0,81	8,10

Tabelle 8. Daten zur Präzision zwischen verschiedenen Assays für **LDL**-Subfraktionen

Probe	N	LDL-1 Durchschnitt (mg/dl)	SA	CV (%)	LDL-2 Durchschnitt (mg/dl)	SA	CV (%)	LDL-3 Durchschnitt (mg/dl)	SA	CV (%)	LDL-4 Durchschnitt (mg/dl)	SA	CV (%)
1	80	41	1,61	3,92	11	1,47	13,50	N/A	-	-	N/A	-	-
2	80	37	1,43	3,86	39	1,50	3,85	14	2,69	19,21	N/A	-	-
3	80	29	1,10	3,79	24	1,73	7,21	20	1,33	6,65	20	1,21	6,05
4	80	24	0,88	3,67	22	1,48	6,73	17	0,95	5,59	20	0,69	3,45

Probe	N	LDL-5 Durchschnitt (mg/dl)	SA	CV (%)	LDL-6 Durchschnitt (mg/dl)	SA	CV (%)	LDL-7 Durchschnitt (mg/dl)	SA	CV (%)
1	80	N/A	-	-	N/A	-	-	N/A	-	-
2	80	N/A	-	-	N/A	-	-	N/A	-	-
3	80	N/A	-	-	N/A	-	-	N/A	-	-
4	80	24	0,62	2,58	17	2,05	12,06	4	1,39	33,90

Linearität

Mit zwei Serumproben, die entweder mit HDL-C oder mit durch Ultrazentrifugation isolierten LDL-C verstärkt waren, wurden Linearitätsstudien durchgeführt.

Probe 1

LDL-C: 695 mg/dl
HDL-C: 260 mg/dl
VLDL-C: 140 mg/dl

Probe 2

LDL-C: 163 mg/dl
HDL-C: 178 mg/dl
VLDL-C: 38 mg/dl

Serielle Verdünnungen wurden mittels einer physiologischen Humanserum-Albuminlösung vorbereitet. Die für LDL-C-, HDL-C- und VLDL-C-Gesamtwerte ermittelten Konzentrationen wurden mit den zu erwartenden Werten verglichen. (Tabellen 9-11) Die prozentuale Wiederherstellungsrate wurde wie folgt berechnet: % Wiederherstellung = (ermittelter Wert/erwarteter Wert) x 100.

Tabelle 9. Verdünnungslinearität für **LDL**

Verdünnung (%)	Ermitteltes LDL (mg/dl)	Erwartetes LDL (mg/dl)	Wiederherstellung (%)
0%	695	695	100,0
10%	627	626	100,2
30%	466	486	95,9
50%	351	348	100,9
70%	195	209	93,3
95%	59	69	85,6

Verdünnung (%)	Ermitteltes LDL (mg/dl)	Erwartetes LDL (mg/dl)	Wiederherstellung (%)
0%	163	163	100,0
5%	155	157	98,7
10%	151	148	102,0
50%	84	89	94,4
90%	15	15	100,0
95%	13	13	100,0

Tabelle 10. Verdünnungslinearität für **HDL**

Verdünnung (%)	Ermitteltes HDL (mg/dl)	Erwartetes HDL (mg/dl)	Wiederherstellung (%)
0%	260	260	100,0
10%	218	234	93,2
30%	174	182	95,9
50%	117	130	90,0
70%	73	78	93,6
90%	25	26	96,2

Verdünnung (%)	Ermitteltes HDL (mg/dl)	Erwartetes HDL (mg/dl)	Wiederherstellung (%)
0%	178	178	100,0
5%	170	169	100,6
10%	162	160	101,3
50%	95	89	106,7
95%	11	9	122,2
97%	5	5,3	94,3

Tabelle 11. Verdünnungslinearität für **VLDL**

Verdünnung (%)	Ermitteltes VLDL (mg/dl)	Erwartetes VLDL (mg/dl)	Wiederherstellung (%)
0%	140	140	100,0
10%	129	126	102,4
30%	99	98	101,0
50%	75	70	107,1
70%	48	42	115,5
90%	22	14	157,1

Verdünnung (%)	Ermitteltes VLDL (mg/dl)	Erwartetes VLDL (mg/dl)	Wiederherstellung (%)
0%	38	38	100,0
5%	36	37	97,3
10%	34	35	97,1
50%	24	24	100,0
90%	17	13	130,8
95%	13	11,4	114,0

Dosisreaktion

Serumprobe A (mit unterschiedlichsten Subfraktionen) wurde mit demselben Volumen wie Probe B vermischt (die hauptsächlich LDL-2 enthält), um AB zu erhalten. Die Proben wurden mit dem Lipoprint-System analysiert, die Cholesterin-Konzentrationen der einzelnen Fraktionen wurden bestimmt und die ermittelten Werte mit den erwarteten Werten verglichen. (Tabelle 12)

Analog dazu wurde eine Serumprobe A (mit unterschiedlichsten Subfraktionen) mit demselben Volumen wie Probe C vermischt (die hauptsächlich LDL-1 enthält), um AC zu erhalten. Die Proben wurden anschließend mit dem Lipoprint-System analysiert, die Cholesterin-Konzentrationen der einzelnen Fraktionen wurden bestimmt und mit den erwarteten Werten verglichen. (Tabelle 13)

Tabelle 12. Ermittelte im Vergleich zu erwarteten Werten für vermischte Probe AB

	A	B	AB		
	mg/dl	mg/dl	Erwartet (mg/dl)	Ermittelt (mg/dl)	Wiederherstellung (%)
VLDL	35	20	28	29	103,6
Mittel-C	37	20	29	28	97,6
Mittel-B	35	15	25	21	84,0
Mittel-A	15	15	15	15	100,0
LDL-1	21	29	25	26	104,0
LDL-2	17	49	33	37	112,1
LDL-3	14	28	21	25	119,0
LDL-4	14	5	10	12	120,0
LDL-5	12	-	6	5	83,8
LDL-6	9	-	4	2	50,0
LDL-7	15	-	7	2	28,8
HDL	29	35	32	35	109,4

Tabelle 13. Ermittelte im Vergleich zu erwarteten Werten für vermischte Probe AC

	A	C	AC		
	mg/dl	mg/dl	Erwartet (mg/dl)	Ermittelt (mg/dl)	Wiederherstellung (%)
VLDL	35	13	24	25	104,2
Mittel-C	37	16	27	25	92,6
Mittel-B	35	11	23	18	78,3
Mittel-A	15	16	16	14	87,5
LDL-1	21	54	38	36	94,8
LDL-2	17	38	28	34	121,4
LDL-3	14	7	11	16	145,4
LDL-4	14	-	7	11	157,1
LDL-5	12	-	6	5	83,3
LDL-6	9	-	4	2	50,0
LDL-7	15	-	7	2	28,6
HDL	29	40	35	37	105,7

Sensitivität

Die Sensitivität des Lipoprint-Systems wurde definiert anhand der kleinsten Konzentration von HDL-C und dem Gesamtwert von LDL-C, die zuverlässig nachweisbar sind. Der Wert wurde bestimmt als Schnittmenge des Konfidenzintervalls unterhalb von 95 % des Mittelwerts mit der x-Achse, wenn eine Verdünnungsreihe der erwarteten im Vergleich zu den tatsächlichen Werten für die einzelnen Lipoprotein-Parameter geplant wird: VLDL-Sensitivität beträgt $\geq 2,02$ mg/dl, HDL-Sensitivität beträgt $\geq 3,65$ mg/dl und LDL-Gesamtsensitivität beträgt $\geq 8,30$ mg/dl.

Störsubstanzen

Mögliche Störsubstanzen wurden in Serumproben übertragen (die entsprechenden Konzentrationen sind in Tabelle 14 aufgelistet) und danach mit unbehandelten Proben (4 Replikate) getestet. Es stellte sich heraus, dass Hämoglobin in Konzentrationen über 200 mg/dl und Heparin, wie es in typischen Konzentrationen in heparinisierten Plasma-Sammelschläuchen vorkommt, die Ergebnisse des Lipoprint-Tests verfälscht.

Tabelle 14. Störsubstanzen

Störsubst.	Konz. (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	Wiederherstellung (%)	LDL-C (mg/dl)	Wiederherstellung (%)	HDL-C (mg/dl)	Wiederherstellung (%)
Keine	-	17 \pm 1,1	100	115 \pm 1,9	100	42 \pm 2,4	100
Bilirubin	20	15 \pm 0,9	89	115 \pm 2,2	100	45 \pm 1,6	107
Hämoglobin	500	28 \pm 0,3	165	106 \pm 2,0	92	40 \pm 2,0	95
Hämoglobin	200	18 \pm 0,2	106	116 \pm 0,7	101	40 \pm 0,6	95
Niacin	2,5	16 \pm 0,7	94	115 \pm 1,5	100	43 \pm 2,0	102
EDTA	200	16 \pm 1,0	94	114 \pm 0,4	99	44 \pm 1,2	105
Heparin	14 U/ml	20 \pm 0,4	118	113 \pm 1,4	98	41 \pm 1,9	98

Vergleich Serum vs. Plasma

Serum- und EDTA-Plasmaproben von 37 Patienten wurden mit dem Lipoprint-System verglichen. Die vom Lipoprint-System generierten Cholesterinwerte (mg/dl) aller Lipoproteinfraktionen und Subfraktionen (N = 322), bis zu 12 pro Probe, wurden geplottet und korreliert:

$$\text{Cholesterin}_{\text{Plasma}} = 0,995 (\text{Cholesterin}_{\text{Serum}}) + 1,158 \quad (r^2 = 0,971)$$

Stabilité des échantillons

Serumproben (N = 22) mit unterschiedlichsten Cholesterin-Konzentrationen, die 7–12 Fraktionen und Subfraktionen enthielten, wurden 7 Tage lang im Kühlschrank aufbewahrt. Es wurden für alle Proben am Tag 3 und Tag 7 Lipoprint-Profile erstellt und die resultierenden Cholesterinwerte aller Lipoprotein-Fraktionen und Subfraktionen (N = 206) verglichen:

$$\text{Cholesterin}_{\text{Tag 3}} = 0,996 (\text{Cholesterin}_{\text{Tag 0}}) + 0,075 \quad (r^2 = 0,976)$$

$$\text{Cholesterin}_{\text{Tag 7}} = 0,964 (\text{Cholesterin}_{\text{Tag 0}}) + 0,758 \quad (r^2 = 0,961)$$

Daraus wurde die Folgerung gezogen, dass Serum und EDTA-Plasma gleichermaßen als Probematerial geeignet sind, und dass die Proben gekühlt bei (2–8 C) bis zu 7 Tage lang aufbewahrt werden können.

Korrelationsgenauigkeit

Das Lipoprint Testsystem wurde mit einer direkten HDL-Methode (EQUAL Diagnostics HDL Direct Liquid Select) und einer direkten LDL-Methode (EQUAL Diagnostics LDL Direct Liquid Select) verglichen. Eine Population von 268 Serumproben mit LDL-C Werten von 55–218 mg/dl (Lipoprint) und 54–215 mg/dl (direktes LDL) und HDL-C-Werten von 24–129 mg/dl (Lipoprint) sowie 26–137direkt mg/dl (direktes HDL) wurde geprüft. (Tabellen 15 und 16)

Tabelle 15.

	Lipoprint HDL	Direktes HDL
N	268	268
Durchschnitt (mg/dl)	53,2	54,8
SA (mg/dl)	15,13	15,43
Regression	Lipoprint HDL = 0,9361 (HDL _{direkt}) + 1,8607	
r ²	0,912	

Tabelle 16.

	Lipoprint LDL	Direktes LDL
N	268	268
Durchschnitt (mg/dl)	121,9	116,3
SA (mg/dl)	30,73	29,58
Regression	Lipoprint LDL = 0,998 (LDL _{direkt}) + 5,7995	
r ²	0,923	

Ein ähnlicher Vergleich wurde zwischen Ultrazentrifugation (β-Quantifizierung) und dem Lipoprint LDL-System angestellt. Eine Population von 40 Serumproben mit LDL-C-Werten von 66–211 mg/dl (Lipoprint) und 68–218 mg/dl (β-Quantifizierung), HDL-C-Werten von 29–91 mg/dl (Lipoprint) und 28–90 mg/dl (β-Quantifizierung) und VLDL-C-Werte zwischen 9,5–49 mg/dl (Lipoprint) sowie 6–57 mg/dl (β-Quantifizierung) wurde überprüft. (Tabellen 17–19)

Tabelle 17.

	Lipoprint LDL	β-Quant LDL
N	40	40
Durchschnitt (mg/dl)	130,8	130,0
SA (mg/dl)	30,14	30,42
Regression	Lipoprint LDL = 0,933 (LDL _{β-Quant}) + 9,430	
r ²	0,887	

Tabelle 18.

	Lipoprint HDL	β-Quant HDL
N	40	40
Durchschnitt (mg/dl)	53,5	53,5
SA (mg/dl)	15,29	15,71
Regression	Lipoprint HDL = 0,944 (HDL _{β-Quant}) + 3,030	
r ²	0,941	

Tabelle 19.

	Lipoprint VLDL	β -Quant VLDL
N	40	40
Durchschnitt (mg/dl)	24,7	22,9
SA (mg/dl)	10,34	12,61
Regression	Lipoprint VLDL = 0,689 (VLDL β -Quant) + 7,990	
r^2	0,8216	

LITERATUR

1. Warnick GR, Wood PD. National Cholesterol Education Program recommendations for measurement of high-density lipoprotein cholesterol: Executive summary. *Clin Chem* 1995; 41/10: 1427-1433.
2. Bachorik PS, Ross JW. National Cholesterol Education Program recommendations for measurement of low-density lipoprotein cholesterol: Executive summary. *Clin Chem* 1995; 41/10: 1414-1420.
3. Griffin BA, Caslake MJ, Yip B, Tait GW, Packard CJ, Shepherd J. Rapid isolation of low density lipoprotein (LDL) subfractions from plasma by density gradient ultracentrifugation. *Atherosclerosis* 1990; 83(1): 59-67.
4. Otvos JD. Measurement of lipoprotein subclass profiles by nuclear magnetic resonance spectroscopy. In: *Handbook of Lipoprotein Testing*, Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH, eds. AACC Press 1999, 2nd edition, Washington, DC. Pages 609-623.
5. Austin MA, Hokanson JE, Brunzell JD. Characterization of low-density lipoprotein subclasses: methodologic approaches and clinical relevance. *Current Opinion in Lipidology* 1994; 5(6): 395-403.
6. Rajman I, Kendall MJ, Cramb R, Holder RL, Salih M, Gammage MD. Investigation of low density lipoprotein subfractions as a coronary risk factor in normotriglyceridaemic men. *Atherosclerosis* 1996; 125(2): 231-242.
7. McNamara JR, Campos H, Ordovas JM, Peterson J, Wilson PW, Schaefer EJ. Effect of gender, age, and lipid status on low density lipoprotein subfraction distribution. Results from the Framingham Offspring Study. *Arteriosclerosis* 1987; 7: 483-490.
8. Krauss RM. Low-density lipoprotein subclass and risk of coronary heart disease. *Current Opinion in Lipidology* 1991; 2: 248-252.
9. Muñiz N. Measurement of plasma lipoproteins by electrophoresis on polyacrylamide gel. *Clin Chem* 1977; 23: 1826-1833.
10. 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): Executive Summary. *NIH Publication* No. 01-3670, May 2001.
11. Stein E, Greer IA, Myers GL. National Cholesterol Education Program recommendations for triglyceride measurement. *Clin Chem* 1995; 41: 421-426.
12. Sattar N, Greer IA, Loudon J, Lindsay G, McConnel M, Shepherd J, Packard C. Lipoprotein Subfraction Changes in Normal Pregnancy. *J. Clin Endocrin. Metab* 1997; 82: 2483-2491.

TECHNISCHE UNTERSTÜTZUNG

- Telefon: +1.310.536.0006
- Fax: +1.310.536.0323
- E-mail: lipoprint@quantimetrix.com
- Webseite: www.quantimetrix.com