

Lipoprint®

LDL Subfractions Kit



REF 48-7002

IVD

CE

EC REP

MDSS GmbH,
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
GermanyQuantimetrix Corporation
2005 Manhattan Beach Blvd.
Redondo Beach, CA 90278
+1.310.536.0006

Dansk

TILSIGTET BRUG OG BRUGERVEJLEDNING

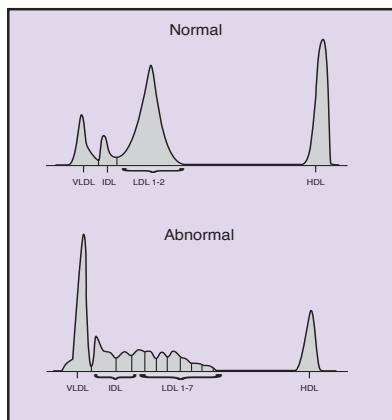
Quantimetrix Lipoprint-systemets LDL-subfrakitionskit "Lipoprint LDL-kit" er et instrument, der er beregnet til måling af lipoproteinkolesterol (til lipoproteinfraktioner og subfraktioner fra VLDL til HDL) i serum og plasma fra fastendte individer med en total kolesterolkoncentration på >100 mg/dl. Lipoproteinkolesterolmålinger anvendes som en hjælp ved evaluering af lipidmetabolismeforstyrrelser i forbindelse med andre lipidtests, bedømmelse af patientrisiko og ved klinisk evaluering.

OPSUMMERING OG FORKLARING AF TESTEN

Plasmalipoproteiner er sfæriske partikler, der er ansvarlige for transport af kolesterol, triglycerider og fosfolipider. Der er fem hovedgrupper af lipoprotein: Chylomikroner, lipoproteiner med meget lav densitet (VLDL), lipoproteiner med middel densitet (IDL), lipoproteiner med lav densitet (LDL) og lipoproteiner med høj densitet (HDL). Et lavt HDL-kolesterol er en stærk uafhængig indikator for koronar hjertesygdom (CHD) [1]. Det er blevet påvist, at forhøjet LDL-kolesterol (LDL-C) udgør en stor risikofaktor for CHD [2]. Det er kendt, at lipoproteingrupperne er heterogene, idet de består af flere subfraktioner, der varierer mht. til partikelstørrelse, densitet og kemisk opbygning. Lipoproteinernes heterogenitet er blevet påvist ved adskilige analytiske metoder, såsom tæthedsgradient-ultracentrifugering [3], nuklear magnetisk resonans (NMR) [4], ikke-denaturerende gradientgel-elektroforese (GGE) [5] og Lipoprint-systemet, et lineært polyakrylamidgelelektroforesesystem [6]. LDL kan oplöses i maksimalt syv LDL-subfraktioner med Lipoprint-systemet.

Disse LDL-subfraktioner er blevet navngivet fra LDL-1, bestående af de største partikler, til LDL-7, bestående af de mindste partikler.

Genetiske såvel som miljømæssige faktorer er ansvarlige for forskellene mht. til graden af LDL-heterogenitet i mennesker. Alder, køn og lipidstatus er kendte for at påvirke LDL-subfrakitionsprofilen [7]. Individer der udviser lipoproteinprofiler, primært bestående af større, lette LDL-1- og LDL-2-subfraktioner, er blevet beskrevet som **Mønster A**, mens profiler med fortrinsvis mindre og tættere subfraktioner (LDL-3 til LDL-7) er blevet beskrevet som **Mønster B** [5]. (Fig. 1)



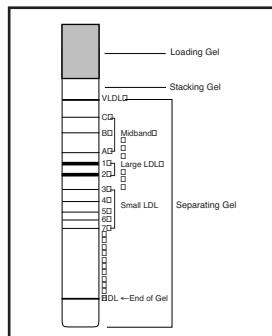
Figur 1. Normale (Mønster A) og abnorme (Mønster B) lipoprotein-profiler

I en undersøgelse af 109 patienter med myokardieinfarkt (MI) viste Austin et al. [5] at LDL-subfraktion Mønster B var forbundet med en trefoldig forøgelse af risikoen for MI, afhængigt af køn, alder og relativ vægt. Krauss [8] rapporterede lignende fund. Rajman et al. [6] rapporterer også om den risikofaktor, der er forbundet med lipoproteinsubfraktioner med en lav densitet hos mænd med et normalt triglyceridniveau.

TESTPRINCIP

Lipoprint-LDL-kittet består af:

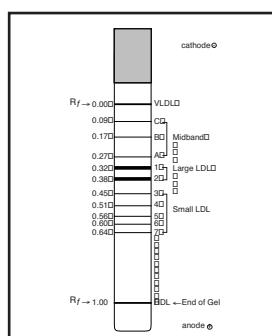
- Forstøbt polyakrylamidgel (Stacking-gel og separationsgel) i glasrør (Fig. 2)
- Flydende loading-gel med et lipofilt farvestof
- Buffersalte



Figur 2. Lipoprint gelrør, skematisk

Farvestoffet bindes proportionalt til den relative mængde kolesterol i hvert lipoprotein [9]. De farvebehandlede lipoproteiner gennemgår derefter elektroforese. Under elektroforesens første fase koncentrerer lipoproteinpartiklerne af loading- og stacking-gelerne i et skarpt aftegnet smalt bånd. Når lipoproteinpartiklerne migrerer gennem separationsgelens matrix, opløses de i lipoproteinbånd i overensstemmelse med deres partikelstørrelser fra de største til de mindste som følge af gelens siende virkning. HDL migrerer længst, fulgt af den lille tætte LDL, større, lette LDL, midterbånd (primært bestående af IDL) og VLDL. Hvis der er chylomikroner til stede, vil de vise sig over stacking-gelen eller forblive i loading-gelen.

En typisk Lipoprint-profil består af 1 VLDL-bånd, 3 midterbånd, op til 7 LDL-bånd og 1 HDL-bånd. Efter elektroforesen er fuldført, identificeres de forskellige farvede lipoproteinfraktioner (bånd), der findes i prøven efter deres mobilitet (R_f), idet VLDL anvendes som startreference-punkt ($VLDL = 0$) og HDL som det ledende referencepunkt ($HDL = 1$). (Fig. 3)



Figur 3. Mobilitet for lipoproteinbåndene

Det relative område for hvert lipoproteinbånd bestemmes og multipliceres med total kolesterolkoncentrationen for prøven, så mængden af kolesterol for hvert bånd fremkommer i mg/dl. Totalkolesterolkoncentrationen i prøven skal måles uafhængigt, f.eks. på en klinisk analysator eller med et point-of-care-instrument.

PRODUKTBESKRIVELSE

Lipoprint LDL-kittet består af forstørte polyakrylamidgelrør med høj opløsning, en loading-gelopløsning indeholdende et lipofilt farvestof og buffersalter.

Reagenser og materialer (medfølgende, se Quantimetrix katalognr. 48-7002)

Et 100-testskit består af:

1. Lipoprint LDL-gelrør 100 rør
Polyakrylamid, buffer, konserveringsmiddel
2. Lipoprint LDL-loading-gel 24 ml
Akrylamid
N, N-methylenbisakrylamid
Lipofilt farvestof
Katalysator
Stabilisator
Buffer
3. Lipoprint LDL-buffersalte 6 hætteglas
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
Borsyre
4. Lipoprint LDL-indlægsseddel 1 stk

Lipoprint-system (ikke medfølgende, se Quantimetrix, katalognr. 48-9150/9152)

1. Computer (omfatter analyseprogrammet LipoWare)
2. Farveprinter
3. Digital scanner
4. Elektroforesekammer
5. Strømforsyning (120 V/220 V)
6. Forberedelsesstativ
7. Forberedelseslys
8. Korrigeringsværktøj

Liposure – Lipoproteinkontrol (ikke vedlagte, se Quantimetrix, katalognr. 48-7060 – Niveau 1)

Nødvendige materialer (ikke medfølgende)

1. Destilleret eller ionbyttet vand
2. 25 µl automatisk pipette
3. 200 µl automatisk pipette
4. Magnetisk omrører
5. Parafilm™
6. Måleglas

Rekonstituering af reagenser

Elektrolytbufferopløsningen rekonstitueres ved at op löse et hætteglas med buffersalte fra Lipoprint LDL-kit i 1200 ml destilleret eller ionbyttet vand.

Opbevaring og stabilitet

Gelrør, loading-gel og buffersalte skal opbevares ved 2–8 °C. **Må ikke fryses.** Ved korrekt opbevaring er åbnede og uåbnede reagenser stabile indtil udløbsdatoen.

ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

Kun til *in vitro*-diagnostisk brug

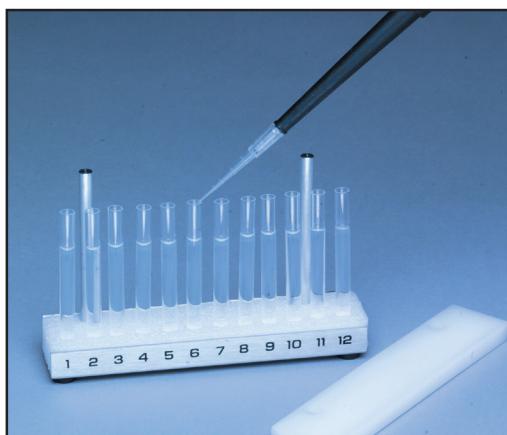
- Brug kun Lipoprint LDL-kittet i overensstemmelse med vejledningen fra Lipoprint-indlægssedlen.
- Loading-gel-opløsningen indeholder akrylamid som er giftigt, når det kommer i kontakt med huden eller indtages. Undgå indånding eller længerevarende udsættelse for loading-gel-opløsningen.
- Loading-gelen er lysfølsom og leveres i en brun glasflaske.
- Undgå at pipettere med munden samt anden fysisk kontakt med reagenser eller prøver.
- Alle prøver, reagenser og kontroller skal håndteres som værende potentiel smitsomme ved indtagelse eller absorbering gennem længerevarende hudkontakt. Håndtering og bortskaffelse af materialer skal altid foregå i overensstemmelse med gældende forholdsregler på stedet.

PRØVER OG PRØVEUDTAGNING

- Der må kun anvendes prøver fra fastende (12 timer).
- Der kan anvendes serum eller EDTA-plasma (se s. 15).
- Der må ikke anvendes heparin som antikoagulans.
- Prøverne kan opbevares i op til 7 dage ved 2–8 °C.
- Frysning af prøven anbefales ikke. Hvis en prøve imidlertid skal fryses, bør den fryses kryogent (-70 °C eller lavere).

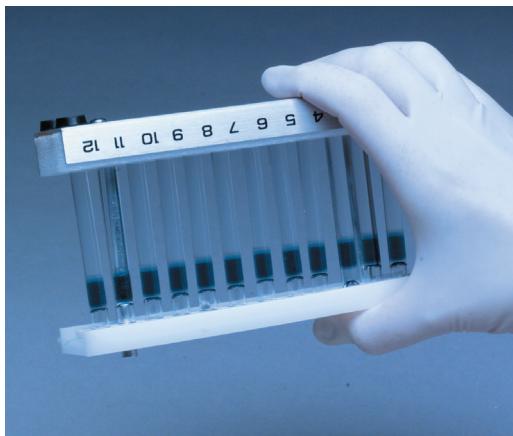
ANALYSEPROCEDURE

1. Forbered elektrolytbufferopløsningen som beskrevet ved at op löse et hætteglas med buffersalte i 1200 ml destilleret eller ionbyttet vand.
2. Fjern gelrørene fra krukken, tør dem af, og placér dem i forberedelsesstativet med den ufuldte ende opad. (Fig. 4) Undgå at berøre enderne af gelrørene eller at trykke på gelen da dette vil medføre luftbobler i gelen. Gelrøret må ikke anvendes, hvis der er luftbobler indvendigt, eller hvis gelen stikker frem.
3. Fjern opbevaringsbufferen helt fra toppen af gelerne ved at ryste stativet under omvending. Om nødvendigt aftørres enden af røret mens rørene er vendt om, så overskydende buffer fjernes fra rørets inderside.
4. Tilsæt 25 µl prøve til hvert rør. (Fig. 4)



Figur 4. Prøvetilsætning

5. Tilsæt 200 µl Lipoprint loading-gel til hvert rør.
6. Placér en strimmel Parafilm mellem gelrørene og låget til forberedelsesstativet så kontaminering undgås. Bland loading-gelen med prøven ved at omvende forberedelsesstativet adskillige gange. (Fig. 5)



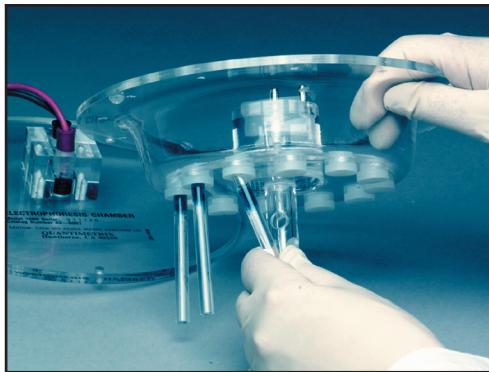
Figur 5. Blanding af loading-gel og prøver

7. Stil forberedelseslyset ret op med pæren øverst. Placér det fyldte forberedelsesstativ således at loading-gelen er i kontakt med pæren. (Fig. 6) Foretag en fotopolymerisering af loading-gelen i 30 minutter (men ikke længere end 40 minutter).



Figur 6. Fotopolymerisering

8. Efter at fotopolymeriseringen er fuldført, fjernes hvert gel-rør fra forberedelsestativet og sættes ind i silikoneadapteren i det øverste kammer. Idet gelrøret holdes i siden, skubbes det op indtil enden med loading-gel på gelrøret flugter med adapterens øverste flade. Gelrøret er lettere at sætte i, hvis toppen vædes først. Undgå berøring af rørets ender under dette trin. Hvis der skal køres mindre end et fuldt kammer, isættes de hertil beregnede små glasrør i de tomme adaptere. Skub rørene ned ovenfra således at de flugter med undersiden af adapteren. (Fig. 7)



Figur 7. Isætning af rør

9. Placér 1000 ml elektrolytbufferopløsning i det nedre kammer og 200 ml i det øvre kammer. Den nedre buffer kan genbruges op til fem gange. **Anvend altid frisk buffer i det øvre kammer.** Buffer skal være tilpasset stuetemperatur (18–27 °C).
10. Når begge kamre er samlet og fyldt med buffer, undersøges hvert rør grundigt for luftbobler. Fjern evt. luftbobler med en pipettespids. Bobler kan blokere for passagen af den elektriske strøm.
11. Sæt låget på elektroforesekammeret og tilslut strømmen. (Fig. 8) Indstil strømforsyningen til levering af en strøm på **3 mA pr. gelrør** (f.eks. 36 mA til 12 rør, 18 mA til 6 rør osv.) Spændingen skal indstilles til maksimal styrke (500 V).



Figur 8. Samlet kammer

12. Elektroforesetiden er ca. 60 minutter. Stands elektroforesen når HDL-fraktionen er omkring 1 cm fra bunden af det hurtigst migrerende gelrør.
13. Når elektroforesen er fuldført, slukkes for strømmen (OFF), kammerets låg fjernes og elektrolytbufferen fra det øvre kammer kasseres. Den nedre buffer kan genbruges op til fem gange. Kasseres efter 7 dage.
14. Før gelrørene fjernes fra elektroforesekammeret, aftørres overskydende buffer. Placér dernæst rørene i forberedelsesstativet så de kan transporteres til analyse på scanneren. Lad gelglassene hvile i mindst 30 minutter, men ikke længere end 2 timer før scanning.

Procedurmæssig bemærkning: Der kan forekomme forandring af separationsgelen overflade og af VLDL-båndet under elektroforesen. Denne ændring kan dog rettes, efter at gelerne er fjernet fra elektroforesekammeret, ved forsigtigt at indføre korrigeringsværktøjet ovenfra ned i loading-gelen og ned langs med glasset. Bevæg overfladen på separationsgelen med en cirkulerende bevægelse. Gelen vil nu vende tilbage til sin normale form. Undgå at løsne loading-gelen når instrumentet tages ud igen (skulle noget af gelen løsne sig fyldes tomrummet med ionbyttet/distilleret vand).

KVALITETSKONTROL

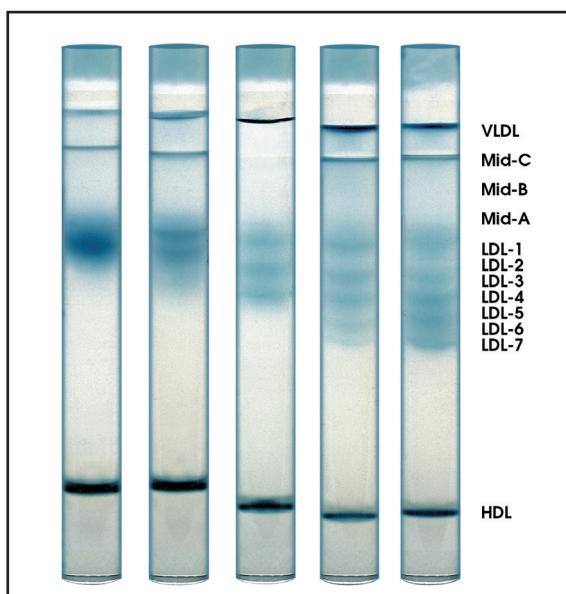
Testresultaternes pålidelighed skal overvåges rutinemæssigt med kontrolmaterialer, der så vidt muligt efterligner ydelsen fra patientprøverne. Det anbefales, at der anvendes kontrolmateriale med hver kørsel af patientprøver. Kontrolmaterialer er kun beregnede til at måle nøjagtighed og præcision. Restitutionen af kontrolværdierne inden for de tildelte områder skal udgøre kriteriet for validering af analysens ydeevne.

Kvalitetskontrol skal udføres i overensstemmelse med lokale og statslige bestemmelser eller akkreditteringskrav. Liposure er et velegnet materiale til kvalitetskontrol og kan fås fra Quantimetrix Corporation.

KVALITATIVE RESULTATER

Bemærkning: De forskellige bånd på Lipoprint-profilen kan identificeres vha. Lipoprint-skabelonen til kvalitativ bedømmelse (homogen LDL-fordeling vs. heterogen fordeling).

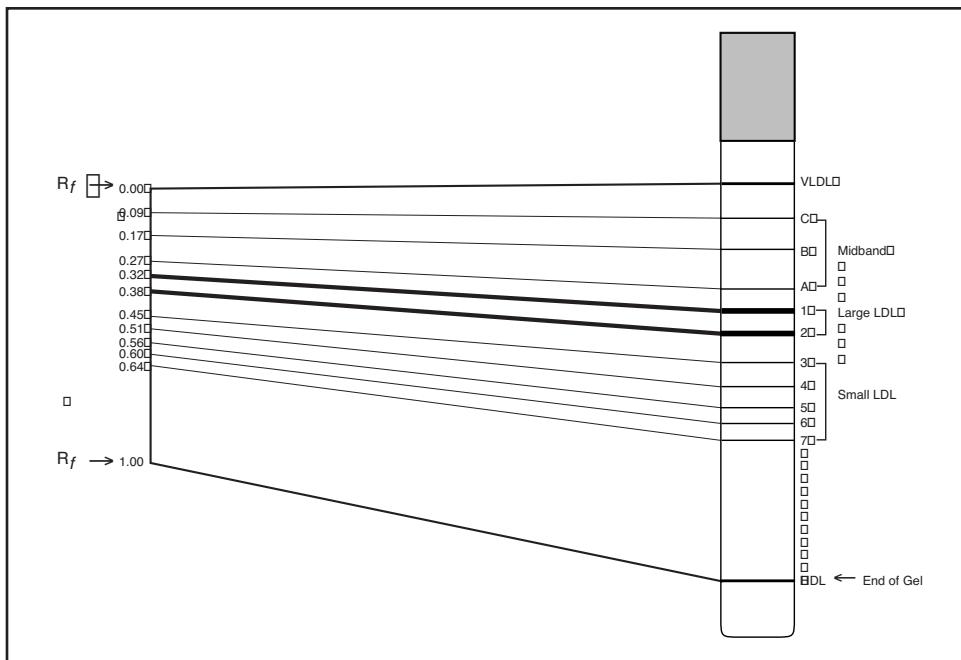
Lipoproteinprofilen afspejler lipidstatus i patientprøven. (Fig. 9) En normal lipoproteinprofil (Mønster A) vil typisk have bånd for VLDL, midterbånd C, B og A (disse består af IDL), LDL-1 og 2 samt HDL. Tilstedevarelsen af yderligere LDL-subfraktioner (LDL-3 til 7) vidner om heterogen LDL (dvs. Mønster B).



Figur 9. Fordeling af lipoproteinsubfraktioner for fem individer – fra et homogent LDL-mønster til venstre mod et mere heterogen mønster til højre.

Brug af Lipoprint-skabelonen:

Lipoprint LDL-systemets skabelon anvendes til at identificere de lipoproteinsubfraktioner, der findes på gelen. (Fig. 10)



Figur 10. LDL subfaktionsskabelon til Lipoprint System

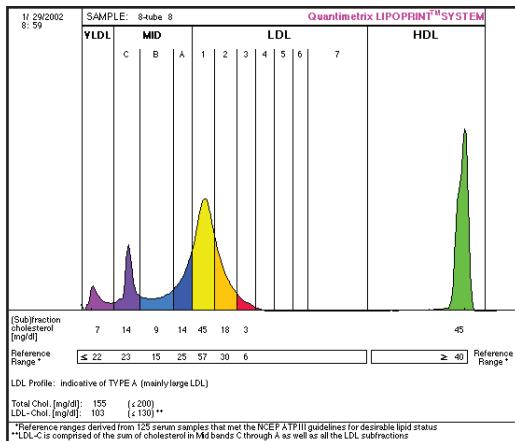
1. Afmærk centrum på hvert lipoproteinbånd med en tusch på glasrøret.
2. Placér VLDL-fraktionen øverst på separationsgelen på linie med stregen på skabelonen mærket "VLDL".
3. Forskyd gelen langs med skabelonen indtil HDL-båndet ligger oven på linien mærket "HDL".
4. Bestem lipoproteinsubfaktionerne i prøven ved at sammenligne båndene på gelen med de modsvarende linier i skabelonen.

KVANTITATIVE RESULTATER

Bemærkning: Den totale kolesterolværdi for hver prøve, der skal analyseres, skal opnås med en klinisk godkendt kolesterolmetode, før der kan genereres kvantitative resultater. **Den totale kolesterolkoncentration i prøven skal være >100 mg/dl.**

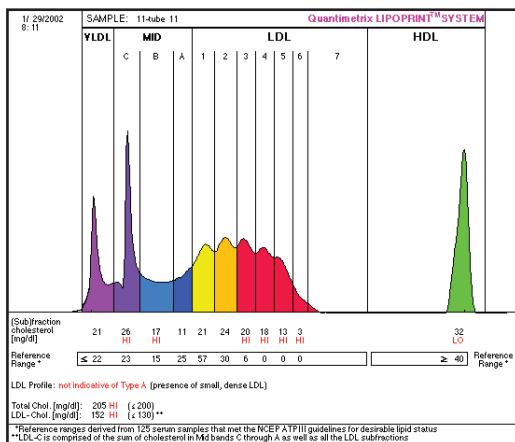
Gelrørene scannes, og det relative område for hver lipoproteinsubfaktion etableres ved at afgene vertikale linier ved forudbestemte afskæringsværdier for hvert bånd. Mængden af kolesterol i hvert lipoproteinbånd beregnes ved at multiplicere båndets relative areal med total kolesterol i prøven. LDL-kolesterol beregnes som summen af kolesterol-koncentrationerne fra samtlige LDL-subfaktioner plus midterbåndene A, B og C.

Lipoproteinsubfaktionprofilerne er traditionelt blevet klassificeret som Type A (normal) og Type B (abnorm) baseret på den gennemsnitlige partikelstørrelse på LDL-partiklerne [5]. En normal Lipoprintprofil med fortrinsvis stor LDL (LDL-1 og LDL-1) stemmer overens med Type A. (Fig. 11)



Figur 11. Typisk normal Lipoprint-profil

Desuden svarer en abnorm Lipoprint-profil med fortrinsvis små LDL (LDL-3 til LDL-7) til Type B som beskrevet i litteraturen. (Fig. 12)



Figur 12. Typisk abnorm Lipoprint-profil

BEGRÆNSNINGER

- Lipoprint LDL-testen skal anvendes sammen med andre data (f.eks. yderligere kliniske tests, lægelige observationer, familiehistorie, osv.).
- Heparin interfererer med separeringen af LDL-subfraktioner.
- Total kolesterol i prøven skal ligge over 100 mg/dl for at undgå overestimering af VLDL-kolesterol.
- Chylomikroner i prøven vil gøre målingen af subfraktionskolesterol ugyldig. Prøvens udseende (dvs. tågethed, uklarhed, flødeagtigt lag på overfladen) efter en nats nedkøling, anvendes til at bekræfte tilstedeværelsen af chylomikroner.
- Lipoprint-resultaterne er ikke blevet evalueret til test af lipoproteiner under graviditet.
- NCEP har ikke udstede retningslinier for optimale/ønskede værdier for LDL-subfraktioner.

FORVENTEDE VÆRDIER

HDL-C og LDL-C

National Cholesterol Education Program (NCEP) har etableret risiko-relatede grænseværdier for LDL-kolesterol og HDL-kolesterol. Disse blev bekræftet med den tredje rapport om NCEP Adult treatment Panel (ATP III) i maj 2001. [10]:

Fraktion	Område	Status
HDL-C	≥ 40 mg/dl	Formindsket risiko ved højere niveauer
	< 40 mg/dl	Forøget risiko
LDL-C	≤ 100 mg/dl	Optimal for patienter med koronar hjertesygdom (CHD)
	< 130 mg/dl	Ønsket
	130 - 159 mg/dl	Grænseværdier for højrisiko
	≥ 160 mg/dl	Højrisiko

LDL-C omfatter alle lipoproteinpartikler med d > 1,006 til 1,063 kg/l, såsom VLDL-rester, IDL, Lp(a) og LDL. [2]. Disse partikler svarer til summen af midterbåndene og LDL-subfraktionerne, som fundet af Lipoprint-systemet.

Subfraktionskolesterol

Forventede normalværdier for de enkelte subfraktioner på Lipoprint-systemet blev etableret som følger: Individer der erklærede sig sunde og rraske, N = 273 (i alderen 18 til 85 år, 166 kvinder og 107 mænd, 47 % kaukasere, 18 % latinamerikanske, 16 % asiatere, 5 % negroide og 14 % uoplyste) blev udvalgt. Disse frivillige gennemgik 12 timers faste. Fuldblod blev udtaget i serumrør ved venepunktur. Serumprøverne blev dernæst anvendt ved tests for indikerede lipidparametre samt til at generere lipoproteinprofilerne med Lipoprint LDL-systemet.

Udelukkelseskriterierne omfattede diabetikere, individer i behandling med lipidsænkende lægemidler og individer som for nylig havde haft hjerteinfarkt. Desuden blev gravide kvinder udelukket fra undersøgelse pga. af deres ændrede lipidstatus [12].

Der blev kun anvendt prøver der imødekom NCEP-retningslinjerne (ATP III) for ønsket lipidstatus [10], især TC < 200 mg/dl, LDL < 130 mg/dl, HDL > 40 mg/dl og triglycerider < 150 mg/dl blev anvendt til at fastlægge de forventede værdier. De normale prøver, N = 114 (i alderen 18 til 84 år, 32 % mænd og 68 % kvinder) blev anvendt til at etablere forventede normalværdier, defineret som 95 % konfidensinterval (middel ± 2 SD) for hvert lipidparameter som opnået på Lipoprint LDL-systemet. (Tabel 1)

Tabel 1 Normal population

	VLDL (mg/dl)	Midterbåndskolesterol			LDL-subfraktionskolesterol			Total LDL (mg/dl)	HDL (mg/dl)	TC (mg/dl)
		Midt-C (mg/dl)	Midt-B (mg/dl)	Midt-A (mg/ dl)	LDL-1 (mg/dl)	LDL-2 (mg/dl)	LDL-3 (mg/dl)			
område	6 - 26	9 - 24	5 - 17	6 - 26	24 - 59	4 - 32	0 - 4	59 - 128	40 - 103	123 - 199
middel	12,9	16,5	10,1	16,6	41,1	14,3	1,9	95,7	56,8	168,1
SD	4,12	2,82	2,40	4,26	7,85	6,82	0,81	16,56	11,29	18,45
95% område	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

* Antal prøver der viste de respektive fraktioner

Det anbefales, at hvert laboratorium etablerer sine egne normalområder, som kan være unikke for populationen, afhængigt af geografisk placering, patienterne eller miljømæssige faktorer.

Data for populationen uden for NCEP-gruppen, N = 141 (i alderen 18 til 77 år, 46 % mænd og 54 % kvinder) fremgår af Tabel 2.

Tabel 2. Population uden for NCEP-retningslinierne.

	VLDL (mg/dl)	Midterbåndskolesterol			LDL-subfraktionskolesterol					Total LDL (mg/dl)	HDL (mg/dl)	TC (mg/dl)
		Midt-C (mg/dl)	Midt-B (mg/dl)	Midt-A (mg/dl)	LDL-1 (mg/dl)	LDL-2 (mg/dl)	LDL-3 (mg/dl)	LDL-4 (mg/dl)	LDL-5 (mg/dl)			
Område	5 - 69	9 - 40	5 - 37	5 - 34	9 - 77	7 - 55	0 - 35	0 - 28	0 - 11	58 - 215	26 - 137	104 - 319
Middel	24,4	23,2	14,6	18,6	46,5	31,5	9,2	4,7	5,5	134,8	54,2	219,4
SD	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% Område	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

* Antal prøver der viste de respektive fraktioner.

SPECIFIKKE FUNKTIONSKARAKTERISTIKA

Præcision

Fire prøver blev testet for henholdsvis intra-assay- og inter-assay-variation. Der blev udvalgt prøver med lav, middel eller høj HDL-C og LDL-C:

Prøve 1: Lav LDL-C, høj HDL-C og homogenet LDL-mønster (kun LDL-1 og 2)

Prøve 2: Middel LDL-C, middel HDL-C og let spredt LDL-mønster (LDL-1, 2 og 3)

Prøve 3: Høj LDL, lav HDL og spredt LDL-mønster (LDL-1,2,3 og 4)

Prøve 4: Høj LDL, middel HDL-C og spredt LDL-mønster (LDL-1 til 7))

Intra-assay-præcision

Prøverne blev testet i 12 replikater (den maksimale kapacitet for elektroforesekammeret).

Præcisionsresultaterne for HDL-C, LDL-C (summen af midterbånd C, B, A og LDL-subfraktioner) og VLDL-C fremgår af Tabel 3.

Tabel 3. Intra-assay-præcisionsresultater for **HDL**, **LDL** og **VLDL**

Prøve	N	HDL-C Middel (mg/dl)	SD	CV (%)	LDL-C Middel (mg/dl)	SD	CV (%)	VLDL-C Middel (mg/dl)	SD	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

Præcisionsdata for midterbånd C, B, A og LDL-subfraktioner 1-7 er vist i Tabel 4 og 5.

Tabel 4. Intra-assay-præcisionsresultater fore **MIDTERBÅND**-subfraktioner

Prøve	N	Midt-C Middel (mg/dl)	SD	CV (%)	Midt-B Middel (mg/dl)	SD	CV (%)	Midt-A Middel (mg/dl)	SD	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

Tabel 5. Intra-assay-præcisionsresultater for **LDL**-subfraktioner.

Prøve	N	LDL-1 Middel (mg/dl)	SD	CV (%)	LDL-2 Middel (mg/dl)	SD	CV (%)	LDL-31 Middel (mg/dl)	SD	CV (%)	LDL-4 Middel (mg/dl)	SD	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

Prøve	N	LDL-5 Middel (mg/dl)	SD	CV (%)	LDL-6 Middel (mg/dl)	SD	CV (%)	LDL-7 Middel (mg/dl)	SD	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

Inter-assay-præcision

Der blev testet fire prøver i duplikat, to gange dagligt i 5 dage, i 4 elektroforesekamre med et enkelt parti gelrør. De modsvarende præcisionsresultater for inter-assay fremgår af Tabel 6–8.

Tabel 6. Inter-assay-præcisionsresultater for **HDL**, **LDL** og **VLDL**

Prøve	N	HDL-C Middel (mg/dl)	SD	CV (%)	LDL-C Middel (mg/dl)	SD	CV (%)	VLDL-C Middel (mg/dl)	SD	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	2,3	1,27	33	2,35	7,12
4	80	50	2,32	4,69	178	2,79	1,57	23	1,97	8,57

Tabel 7. Inter-assay-præcisionsresultater for **MIDTERBÅNDS**-subfraktioner

Prøve	N	C Interm. Middel (mg/dl)	SD	CV (%)	B Interm. Middel (mg/dl)	SD	CV (%)	A Interm. Middel (mg/dl)	SD	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

Tabel 8. Inter-assay-præcisionsresultater for **LDL**-subfraktioner

Prøve	N	LDL-1 Middel (mg/dl)	SD	CV (%)	LDL-2 Middel (mg/dl)	SD	CV (%)	LDL-3 Middel (mg/dl)	SD	CV (%)	LDL-4 Middel (mg/dl)	SD	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

Prøve	N	LDL-5 Middel (mg/dl)	SD	CV (%)	LDL-6 Middel (mg/dl)	SD	CV (%)	LDL-7 Middel (mg/dl)	SD	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

Linearitet

Linearitetsundersøgelser blev udført med to serumprøver der var forstærket med enten HDL-C eller LDL-C isoleret ved ultracentrifugering.

Prøve 1

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

Prøve 2

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

Serielle fortyndinger blev forberedt ved at anvende en fysiologisk human serum-albuminopløsning. De observerede koncentrationer for total LDL-C, HDL-C og VLDL-C blev sammenlignet med de forventede værdier. (Tabler 9–11) Procentvis restitution blev beregnet som følger: % restitution = (observeret værdi/forventet værdi) × 100.

Tabel 9. Fortyndingslinearitet for **LDL**

Fortynding (%)	Observeret LDL (mg/dl)	Forventet LDL (mg/dl)	Restitution (%)
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

Fortynding (%)	Observeret LDL (mg/dl)	Forventet LDL (mg/dl)	Restitution (%)
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

Tabel 10. Fortyndingslinearitet for **HDL**

Fortynding (%)	Observeret HDL (mg/dl)	Forventet HDL (mg/dl)	Restitution (%)
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

Fortynding (%)	Observeret HDL (mg/dl)	Forventet HDL (mg/dl)	Restitution (%)
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

Tabel 11. Fortyndingslinearitet for **VLDL**

Fortynding (%)	Observeret VLDL (mg/dl)	Forventet VLDL (mg/dl)	Restitution (%)
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

Fortynding (%)	Observeret VLDL (mg/dl)	Forventet VLDL (mg/dl)	Restitution (%)
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

Dosisrespons

Serumprøve A (indeholdende et bredt område af subfraktioner) blev blandet med en tilsvarende mængde af prøve B (primært indeholdende LDL-2) så der fremkom AB. Prøverne blev analyseret med Lipoprint-systemet, kolesterolkoncentrationerne fra de enkelt fraktioner blev bestemt, og de observerede værdier blev sammenlignet med de forventede værdier. (Tabel 12)

Tilsvarende blev serumprøve A (indeholdende et bredt område af subfraktioner) blandet med en tilsvarende mængde fra prøve C (primært indeholdende LDL-1) så der fremkom AC. Prøverne blev analyseret med Lipoprint-systemet og kolesterolkoncentrationerne fra de enkelte fraktioner blev bestemt og sammenlignet med de forventede værdier. (Tabel 13)

Tabel 12. Observerede vs. forventede værdier for blandingsprøve AB

	A	B	AB		
	mg/dl	mg/dl	Forventet (mg/dl)	Observeret (mg/dl)	Restitution (%)
VLDL	35	20	28	29	103,6
Midt-C	37	20	29	28	97,6
Midt-B	35	15	25	21	84,0
Midt-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

Tabel 13. Observerede vs. forventede værdier for blandingsprøve AC

	A	C	AC		
	mg/dl	mg/dl	Forventet (mg/dl)	Observeret (mg/dl)	Restitution (%)
VLDL	35	13	24	25	104,2
Midt-C	37	16	27	25	92,6
Midt-B	35	11	23	18	78,3
Midt-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

Følsomhed

Følsomheden for Lipoprint-systemet blev defineret som minimumskoncentrationen af HDL-C og total LDL-C der kan detekteres med sikkerhed. Det blev bestemt som skæringspunktet for de nedre 95% af konfidensintervallet for middelværdien med x-aksen når fortyndingsserien af forventede værdier blev stillet op over for de aktuelle værdier for de individuelle lipoprotein-parametre. VLDL-følsomhed er $\geq 2,02$ mg/dl, HDL-følsomhed er $\geq 3,65$ mg/dl og total LDL-følsomhed er $\geq 8,30$ mg/dl.

Interferens

Potentiel interfererende stoffer blev injiceret i serumprøverne, ved koncentrationer som fremgår af Tabel 14, og derefter testet med ukompromitterede prøver (4 replikater). Hæmoglobin ved koncentrationer over 200 mg/dl og heparin ved koncentrationer, der typisk findes i heparinplasmaopsamlingsrør, blev fundet at interferere med Lipoprint-testen.

Tabel 14 Interferens

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

Sammenligning af serum og plasma

Der blev sammenlignet serum- og EDTA-plasmaprøver fra 37 patienter på Lipoprint-systemet. Kolesterolværdierne (mg/dl) fra alle lipoproteinfraktioner og subfraktioner (N = 322), op til 12 pr. prøve, der blev genereret af Lipoprint-systemet, blev stillet op og korreleret:

$$\text{Kolesterol}_{\text{plasma}} = 0,995 (\text{Kolesterol}_{\text{serum}}) + 1,158 \quad (r^2 = 0,971)$$

Prøvestabilitet

Se guardaron en el frigorífico durante 7 días muestras de suero (N = 22) con una amplia gama de concentraciones de colesterol y con fracciones y subfracciones 7–12. Los perfiles Lipoprint de todas las muestras fueron generados en los días 3 y 7, y se compararon los valores de colesterol resultantes de todas las fracciones y subfracciones de lipoproteínas (N = 206):

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

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

Det blev konkludert, at serum og EDTA-plasma er lige velegnede til prøver, og at prøverne kan opbevares i køleskab (2–8 °C) i op til 7 dage.

Nøjagtighed ved korrelation

Lipoprint-testsystemet blev sammenlignet med en direkte HDL-metode (EQUAL Diagnostics HDL Liquid Select) og en direkte LDL-metode (EQUAL Diagnostics LDL Direct Liquid Select). En population på 268 serumprøver med LDL-C i området fra 55–218 mg/dl (Lipoprint) og 54–215 mg/dl (direkte LDL) såvel som HDL-C i området 24–129 mg/dl (Lipoprint) og 26–137 mg/dl (direkte HDL) blev evalueret. (Tabel 15 og 16)

Tabel 15.

	Lipoprint HDL	Direkte HDL
N	268	268
Middel (mg/dl)	53,2	54,8
SD (mg/dl)	15,13	15,43
Regression	Lipoprint HDL = 0,9361 (HDL _{direkte}) + 1,8607	
r ²	0,912	

Tabel 16.

	Lipoprint LDL	Direkte LDL
N	268	268
Middel (mg/dl)	121,9	116,3
SD (mg/dl)	30,73	29,58
Regression	Lipoprint LDL = 0,998 (LDL _{direkte}) + 5,7995	
r ²	0,923	

En lignende sammenligning blev udført mellem ultracentrifugering (β-kvantificering) og Lipoprint LDL-systemet. Der blev evalueret en population på 40 serumprøver med LDL-C i området fra 66–211 mg/dl (Lipoprint) og 68–218 mg/dl (β-Quantification), HDL-C i området 29–91 mg/dl (Lipoprint) og 28–90 mg/dl (β-kvantificering) såvel som VLD-C i området 9,5–49 mg/dl (Lipoprint) og 6–57 mg/dl (β-kvantificering). (Tabel 17–19)

Tabel 17.

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

Tabel 18.

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

Tabel 19.

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

REFERENCER

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: 421-1426.
12. Sattar N, Greer IA, Louden J, Lindsay G, McConnel M, Shepherd J, Packard C. Lipoprotein Subfraction Changes in Normal Pregnancy. *J. Clin Endocrinol. Metab* 1997; 82: 2483-2491.

TEKNISK SUPPORT

- Telefon: +1.310.536.0006
- Fax: +1.310.536.0323
- Correo electrónico: lipoprint@quantimetrix.com
- Website: www.quantimetrix.com