Lipoprint®
LDL Subfractions Kit

Quantimetrix

REF 48-7002 IVD CE EC REP MDSS GmbH Schiffgraben 41 30175 Hannover, Germany 2° C 8° C

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

Italiano

USO PREVISTO E INDICAZIONI PER L'USO

Il kit delle sottofrazioni LDL del sistema Lipoprint di Quantimetrix, "Kit Lipoprint LDL", è un dispositivo che serve a misurare il colesterolo lipoproteico (per le frazioni lipoproteiche comprese tra VLDL e HDL) nel siero o nel plasma a digiuno con una concentrazione di colesterolo totale >100 mg/dl. Le misurazioni del colesterolo lipoproteico sono utili per la valutazione dei disturbi del metabolismo lipidico se usate insieme con altre analisi dei lipidi, con la valutazione dei rischi cui il paziente è soggetto e con una valutazione clinica.

RIEPILOGO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Le lipoproteine del plasma sono particelle sferiche preposte al trasporto del colesterolo, dei trigliceridi e dei fosfolipidi. Esistono cinque principali classi di lipoproteine: chilomicroni, lipoproteine a densità molto bassa (VLDL), lipoproteine a densità intermedia (IDL), lipoproteine a bassa densità (LDL) e lipoproteine ad alta densità (HDL). Il colesterolo HDL basso è un forte predittore indipendente di malattia cardio-coronarica (CHD) [1]. Il colesterolo LDL (LDL-C) elevato è stato identificato come un importante fattore di rischio per la CHD [2]. È noto che le classi lipoproteiche sono eterogenee e costituite da più sottofrazioni che variano in relazione alle dimensioni, alla densità e alla composizione chimica delle particelle. L'eterogeneità delle lipoproteine è stata dimostrata da varie metodiche di analisi quali l'ultracentrifugazione in gradiente di densità [3], la risonanza magnetica nucleare (RMN) [4], l'elettroforesi su gradiente di gel non-denaturante (GGE) [5] e il sistema Lipoprint, un sistema di elettroforesi su gel di poliacrilammide lineare [6].

Il sistema Lipoprint consente di separare le LDL in un massimo di sette sottofrazioni LDL. Le sottofrazioni LDL sono state denominate LDL-1, costituite da particelle più grandi, fino a LDL-7, costituite dalle particelle più piccole.

Le differenze nel grado di eterogeneità delle LDL tra i soggetti sono determinate da fattori genetici e ambientali. È noto che l'età, il sesso e lo stato lipidico influiscono sul profilo delle sottofrazioni LDL [7]. Gli individui che evidenziano profili lipoproteici costituiti principalmente da sottofrazioni LDL-1 e LDL-2, lipoproteine più grandi e galleggianti, sono stati inseriti nello **Schema A**, mentre profili con sottofrazioni prevalentemente più piccole e dense (da LDL-3 a LDL-7) sono stati inseriti nello **Schema B** [5] (Fig. 1).

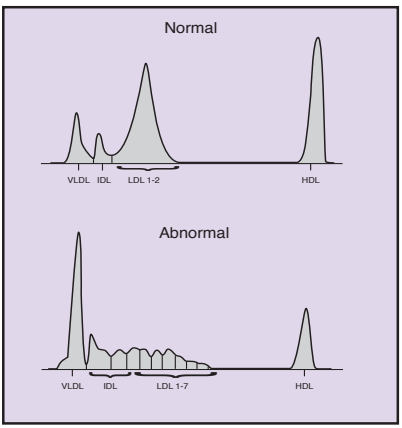

Figura 1. Profili lipoproteici normale (Schema A) e anormale (Schema B)

In uno studio cui hanno partecipato 109 pazienti affetti da infarto del miocardio (IM), Austin et al. [5] ha dimostrato che lo Schema B di sottofrazioni LDL è associato a un rischio di IM tre volte superiore, indipendentemente dal sesso, dall'età e dal peso relativo. Krauss [8] ha riportato reperti simili. Rajman et al. [6] ha riportato anche riguardo al fattore di rischio associato alle sottofrazioni lipoproteiche a bassa densità negli uomini con trigliceridi normali.

PRINCIPIO DEL TEST

Il kit Lipoprint LDL è costituito da:

- gel di poliacrilammide lineare pronto (gel dio accatastamento e gel di separazione) in una provetta di vetro (Fig. 2)
- gel di caricamento del liquido con un colorante lipofilico
- sali tampone

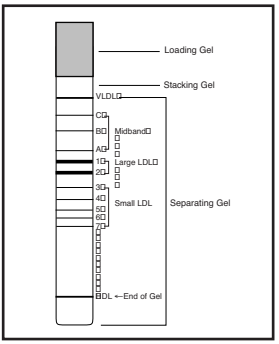

Figura 2. Schema della provetta di gel Lipoprint

Il colorante si lega in proporzione alla quantità relativa di colesterolo in ciascuna lipoproteina [9]. Le lipoproteine premarcate vengono successivamente sottoposte a elettroforesi. Durante la prima parte del processo elettroforetico, le particelle lipoproteiche vengono concentrate dai gel di caricamento e di accatastamento in una banda stretta e netta. Man mano che le particelle lipoproteiche migrano attraverso la matrice del gel di separazione, vengono risolte in bande lipoproteiche in base alle dimensioni delle particelle che le compongono, dalle più grandi alle più piccole in virtù dell'azione di filtrazione del gel: le HDL vanno più lontano, seguite dalle LDL piccole e dense, dalle LDL più grandi e galleggianti, dalle intermedie (costituite principalmente da IDL) e dalle VLDL. I chilomicroni, se presenti, appaiono sopra il gel di accatastamento o rimangono nel gel di caricamento.

Un profilo Lipoprint tipico è costituito da 1 banda VLDL, 3 bande intermedie, massimo 7 bande LDL e 1 banda HDL. Al termine dell'elettroforesi, le varie frazioni lipoproteiche marcate (bande) nel campione vengono identificate in base alla loro mobilità (Rf) usando le VLDL come punto di riferimento iniziale (VLDL = 0) e HDL come punto di partenza (HDL = 1) (Fig. 3).

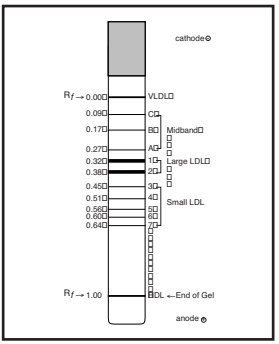

Figura 3. Mobilità delle bande lipoproteiche

L'area relativa per ciascuna banda lipoproteica viene determinata e moltiplicata per la concentrazione del colesterolo totale del campione per ottenere la quantità di colesterolo per ciascuna banda in mg/dl. La concentrazione di colesterolo totale del campione deve essere misurata indipendentemente, ovvero con un analizzatore clinico o uno strumento di una struttura sanitaria.

DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il kit Lipoprint LDL comprende provette pronte di gel di poliacrilammide ad alta risoluzione, una soluzione di gel di caricamento contenente un colorante lipofilico e sali tampone.

Reagenti e materiali (forniti, consultare il catalogo Quantimetrix N. 48-7002)
Un kit di 100 test comprende:

1.	provette di gel Lipoprint LDL poliacrilammide, soluzione tampone, conservante	100 provette
2.	gel di caricamento Lipoprint LDL Acrilammide N, N-metilenebisacrilammide colorante lipofilico catalizzatore stabilizzatore tampone	24 ml
3.	sali tampone Lipoprint LDL Tris (idrossimetile) aminometano acido borico	6 fiale
4.	Foglio illustrativo del prodotto Lipoprint LDL	1 per kit

Sistema Lipoprint (non fornito, consultare il catalogo Quantimetrix N. 48-9150/9152)
1. Computer (comprende il programma di analisi LipoWare)
2. Stampante a colori
3. Scanner digitale
4. Camera per elettroforesi
5. Alimentatore (120 V/220 V)
6. Rack di preparazione
7. Luce di preparazione
8. Strumento di riformatura

Liposure – Controllo delle lipoproteine (non fornito, consultare il catalogo Quantimetrix N. 48-7060 – Livello 1)

Materiali necessari (non forniti)
1. Acqua distillata o deionizzata
2. Pipettatore automatico da 25 µl
3. Pipettatore automatico da 200 µl
4. Agitatore magnetico
5. Parafilm™
6. Cilindri graduati

Reconstitution of Reagents

La soluzione tampone elettrolitica si ricostituisce dissolvendo una fiala di sali tampone del kit Lipoprint LDL in 1200 ml di acqua distillata o deionizzata.

Conservazione e stabilità

Le provette di gel, il gel di caricamento e i sali tampone devono essere conservati a 2–8 °C. **Non congelare**. Se conservati correttamente, i controlli, aperti o non aperti, rimangono stabili fino alla data di scadenza.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Esclusivamenteper uso diagnostico *in vitro*

- Usare il kit Lipoprint LDL solo attenendosi alle istruzioni contenute sul foglietto illustrativo Lipoprint.
- La soluzione del gel di caricamento contiene acrilammide che è una sostanza tossica se viene a contatto con la cute o se viene ingerita. Evitare l'inalazione e l'esposizione prolungata alla soluzione del gel di caricamento.
- Il gel di caricamento è sensibile alla luce ed è racchiuso all'interno di una boccetta di vetro color ambra.
- Evitare di pipettare con la bocca ed evitare qualsiasi contatto fisico con i reagenti o i campioni.
- Tutti i campioni, i reagenti e i controlli devono essere trattati come potenzialmente infetti se ingeriti o assorbiti attraverso un contatto prolungato con la cute. Osservare sempre le precauzioni rilevanti per la struttura in cui si opera in relazione alla manipolazione e allo smaltimento dei materiali.

CAMPIONI E PRELIEVO DEI CAMPIONI

- Usare solo campioni prelevati a digiuno (12 ore).
- Si può usare siero o plasma EDTA (vedere a pag. 15).
- Non usare eparina come anticoagulante.
- I campioni possono essere conservati per un massimo di 7 giorni a 2–8 °C.
- Si sconsiglia di congelare i campioni. Tuttavia, se è necessario congelare il campione, questo deve essere congelato criogenicamente (a –70 °C o una temperatura inferiore).

PROCEDURA DI ANALISI

1. Preparare la soluzione tampone elettrolitica come descritto dissolvendo una fiala di sali tampone in 1200 ml di acqua distillata/deionizzata.
2. Rimuovere le provette di gel dalla vaschetta, pulirle e collocarle nel rack di preparazione con l'estremità non riempita rivolta in su (Fig. 4). Evitare di toccare le estremità della provetta di gel o di esercitare pressione sui gel in quanto ciò causa l'introduzione di bolle d'aria nel gel. Non usare la provetta di gel se si nota la presenza di bolle d'aria al suo interno o fuoriuscita di gel.
3. Rimuovere completamente il tampone di conservazione dalla parte superiore dei gel agitando il rack in posizione capovolta. Se necessario, asciugare l'estremità della provetta con della carta assorbente mentre le provette sono capovolte per rimuovere il tampone in eccesso dall'interno della provetta.
4. Applicare 25 µl di campione in ciascuna provetta (Fig. 4).

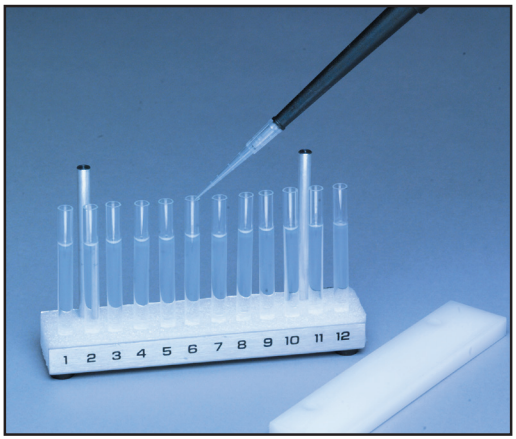

Figura 4. Applicazione del campione

5. Aggiungere 200 µl di gel di caricamento Lipoprint in ciascun provetta.
6. Collocare una striscia di Parafilm tra le provette di gel e il coperchio del rack di preparazione per evitare la contaminazione. Miscelare il gel di caricamento con il campione invertendo più volte il rack di preparazione (Fig. 5).

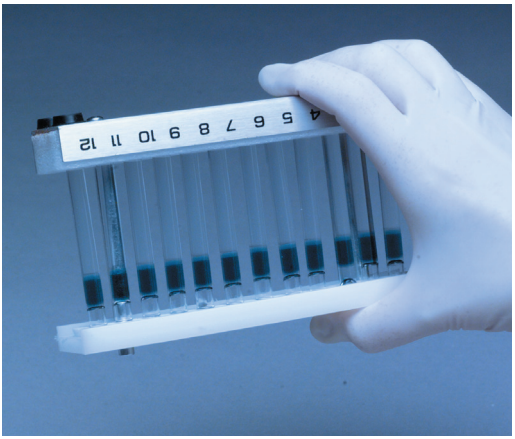

Figura 5. Miscelazione del gel di caricamento e dei campioni

7. Collocare la luce di preparazione in posizione verticale con la lampadina rivolta verso l'alto. Posizionare il rack di preparazione caricato in modo che il gel di caricamento tocchi la lampadina (Fig. 6). Fotopolimerizzare i gel di caricamento per 30 minuti (ma per non oltre 40 minuti).

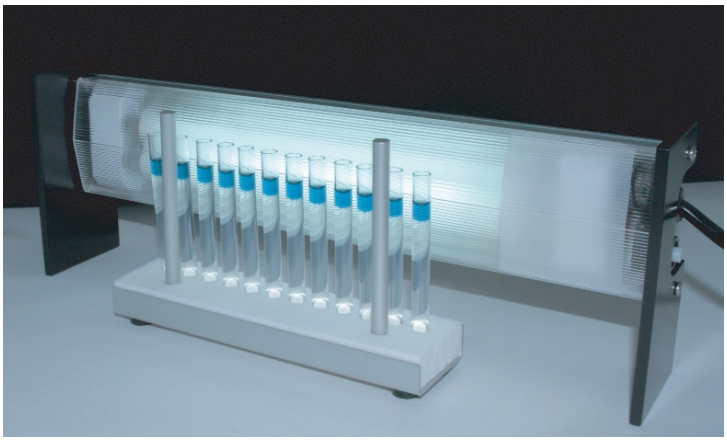

Figura 6. Fotopolimerizzazione

8. Al termine della fotopolimerizzazione, rimuovere la provetta di gel dal rack di preparazione e inserirla con cautela nell'adattatore in silicone della camera superiore. Tenendo la provetta di gel lateralmente, spingerla finché il lato con il gel di caricamento è a filo della parte superiore dell'adattatore. Inumidire la sommità della provetta di gel per agevolare l'inserimento. Evitare di toccare le estremità della provetta nel corso di questa operazione. Se non si riesce a riempire la camera, inserire negli adattatori vuoti le piccole provette di vetro fornite a tale scopo. Spingere le provette dalla sommità in modo che siano a filo della parte inferiore dell'adattatore (Fig. 7).

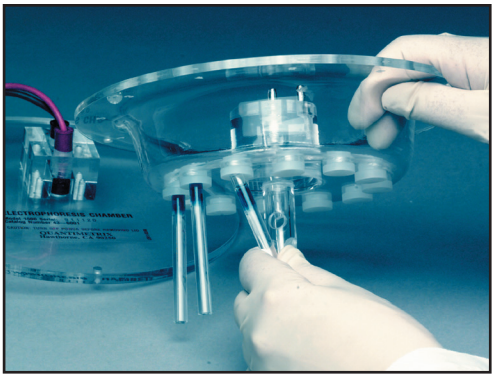

Figura 7. Caricamento delle provette

9. Collocare 1000 ml di soluzione tampone elettrolitica nella camera inferiore e 200 ml nella camera superiore. La soluzione tampone inferiore può essere riutilizzata al massimo cinque volte. **Nella camera superiore usare solo soluzione tampone fresca.** La soluzione tampone deve essere a temperatura ambiente (18–27 °C).
10. Quando entrambe le camere sono montate e si riempiono di soluzione tampone, esaminare attentamente ciascuna provetta per rilevare l'eventuale presenza di bolle d'aria. Eliminare eventuali bolle con una punta del pipettatore. Le bolle possono ostruire il passaggio della corrente elettrica.
11. Mettere il coperchio della camera per elettroforesi al suo posto e collegare la camera all'alimentazione elettrica (Fig. 8). Regolare la corrente in modo che siano erogati **3 mA per ciascuna provetta di gel** (ovvero 36 mA per 12 provette, 18 mA per 6 provette, ecc.). La tensione deve essere impostata sul massimo valore di erogazione (500 V).

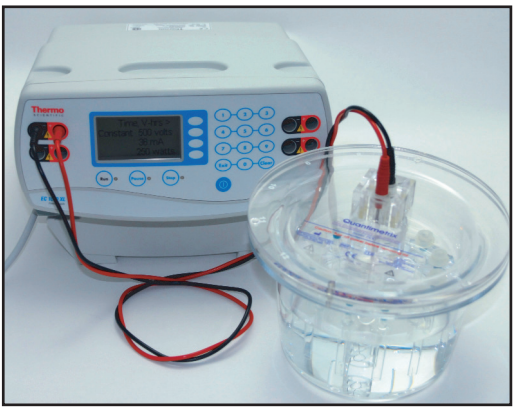

Figura 8. Camera montata

12. La durata dell'elettroforesi è di circa 60 minuti. Arrestare l'elettroforesi quando la frazione HDL è di circa 1 cm dalla parte inferiore della provetta di gel che migra più velocemente.
13. Al termine dell'elettroforesi, SPEGNERE disattivando l'alimentazione elettrica, rimuovere il coperchio della camera e gettare la soluzione tampone elettrolitica della camera superiore. La soluzione tampone inferiore può essere conservata e riutilizzata massimo cinque volte. Gettarla dopo 7 giorni.
14. Prima di rimuovere le provette di gel dalla camera per elettroforesi, rimuovere la soluzione tampone in accesso, quindi collocarle nel rack di preparazione per il trasporto allo scanner per l'analisi. Prima della scansione, lasciare riposare le provette con gel per almeno 30 minuti, ma non più di 2 ore.

Nota sulla procedura: *durante l'elettroforesi potrebbe aver luogo una distorsione della superficie del gel di separazione e della banda VLDL. La distorsione si corregge dopo la rimozione dei gel dalla camera per elettroforesi introducendo con cautela lo strumento di riformatura dalla parte superiore del gel, lungo il vetro con un movimento circolare sulla superficie del gel di separazione. Il gel ritorna alla sua forma normale. Evitare di spostare il gel quando si estrae lo strumento (se il gel si sposta, riempire il vuoto con acqua deionizzata/distillata).*

CONTROLLO QUALITÀ

L'affidabilità dei risultati dei test deve essere controllata regolarmente con materiale di controllo che emuli ragionevolmente il rendimento sui campioni dei pazienti. Si raccomanda l'uso del materiale di controllo qualità con ciascun ciclo di analisi dei campioni dei pazienti. I materiali di controllo devono essere usati solo per monitorare l'accuratezza e la precisione. Il recupero dei valori di controllo entro range idonei deve essere il criterio di convalida del rendimento dell'analisi.

Il controllo della qualità dourebbe essere eseguito in con locale, stato e federale regolamentio. Un materiale di controllo qualità appropriato, Liposure, è disponibile presso Quantimetrix Corporation.

RISULTATI QUALITATIVI

Nota: *Le varie bande di un profilo Lipoprint possono essere identificate usando il template Lipoprint ai fini di una valutazione qualitativa (distribuzione LDL omogenea rispetto a una distribuzione eterogenea).*

Il profilo lipoproteico riflette lo stato lipidico del campione del paziente (Fig. 9). Un profilo lipoproteico normale (Schema A) solitamente è costituito da bande VLDL; bande intermedie C, B e A (che comprendono IDL); LDL-1 e 2 e HDL. La presenza di sottofrazioni LDL aggiuntive (da LDL-3 a 7) è indicativa di LDL eterogenee LDL (ovvero Schema B).

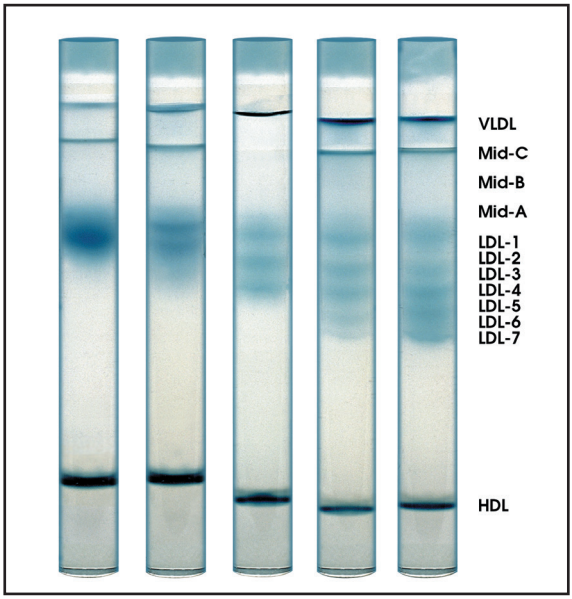

Figura 9. Distribuzione delle sottofrazioni lipoproteiche per cinque soggetti – da uno schema LDL omogeneo a sinistra a uno schema progressivamente più eterogeneo a destra.

Uso del template Lipoprint
Il template del sistema Lipoprint LDL serve a identificare le sottofrazioni lipoproteiche presenti sul gel (Fig. 10).

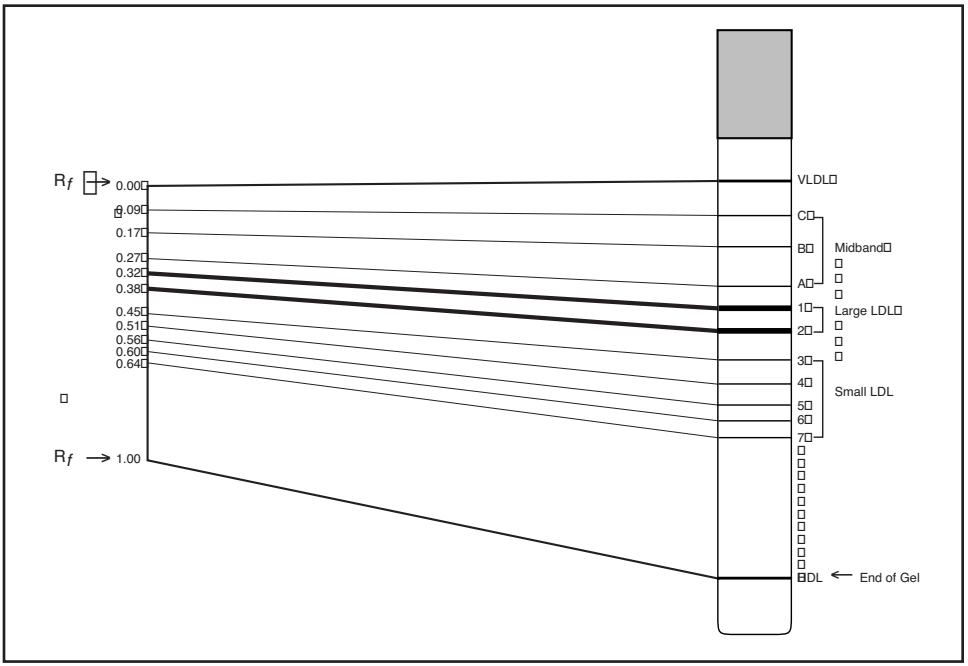

Figura 10. Template delle sottofrazioni LDL del sistema Lipoprint

1. Con un marcado penna, contrassegnare sulla provetta di vetro il centro di ciascuna banda lipoproteica presente.
2. Allineare la frazione VLDL in cima al gel di separazione con la linea presente sul template contrassegnata con “VLDL”.
3. Far scorrere il gel lungo il template finché la banda HDL si sovrappone alla linea contrassegnata con “HDL”.
4. Determinare le sottofrazioni lipoproteiche presenti nel campione abbinando le bande sul gel alle linee corrispondenti sul template.

RISULTATI QUANTITATIVI
Nota: *prima di generare i risultati quantitativi occorre ottenere un valore per il colesterolo totale per ciascun campione da analizzare usando una metodica di analisi del colesterolo approvata per l’uso clinico.* ***La concentrazione del colesterolo totale del campione deve essere >100 mg/dl.***

Le provette di gel vengono sottoposte a scansione e si stabilisce l’area relativa di ogni sottofrazione lipoproteica tracciando delle linee verticali in corrispondenza di range di cutoff predeterminati per ciascuna banda. La quantità di colesterolo in ciascuna banda lipoproteica viene calcolata moltiplicando l’area relativa di ciascuna banda per il colesterolo totale presente nel campione. Il colesterolo LDL viene calcolato come la somma delle concentrazioni di colesterolo di tutte le sottofrazioni LDL più le bande intermedie A, B e C.

Da sempre i profili delle sottofrazioni lipoproteiche sono classificati in Tipo A (normale) e Tipo B (anormale) in base alle dimensioni medie delle particelle LDL [5]. Un profilo Lipoprint normale costituito prevalentemente da LDL grandi (LDL-1 e LDL-2) corrisponde al Tipo A (Fig. 11).

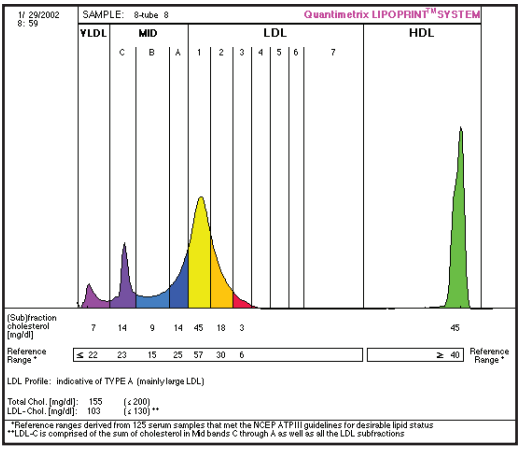

Figura 11. Profilo Lipoprint normale tipico

Un profilo Lipoprint anormale costituito prevalentemente da LDL piccole (da LDL-3 a LDL-7) corrisponde al Tipo B, come descritto nella letteratura (Fig. 12).

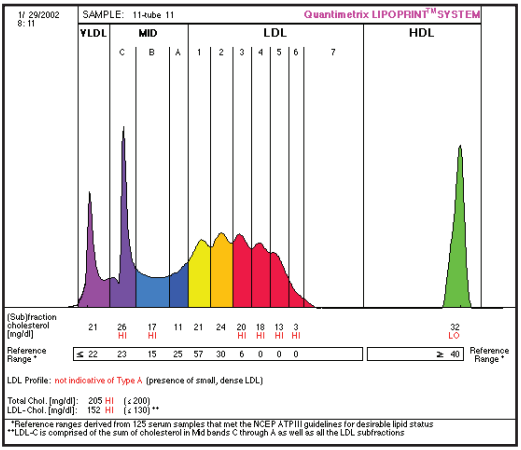

Figura 12. Profilo Lipoprint anormale tipico

LIMITI

- Il test Lipoprint LDL deve essere usato insieme ad altri dati (ad esempio, altre analisi cliniche, osservazioni fisiche, storia famigliare, ecc.).
- L'eparina interferisce con la separazione delle sottofrazioni LDL.
- Per evitare una sottostima del colesterolo VLDL, il colesterolo totale nel campione deve essere superiore a 100 mg/dl.
- I chilomicroni nel campione invalidano la misurazione del colesterolo nelle sottofrazioni lipoproteiche. L'aspetto del campione (ovvero nebulosità, torbidità o presenza di uno strato cremoso sul campione) dopo la refrigerazione notturna deve essere usato come test di conferma della presenza di chilomicroni.
- I risultati Lipoprint non sono stati valutati per l'analisi delle lipoproteine durante la gravidanza.
- Il National Cholesterol Education Program (NCEP) non ha pubblicato le linee guida per i valori ottimali/auspicabili per le sottofrazioni LDL.

VALORI ATTESI

HDL-C e LDL-C

L'NCEP ha stabilito i punti di cutoff relativi ai rischi per il colesterolo LDL e il colesterolo HDL. Questi sono stati riaffermati nel maggio 2001 dal terzo rapporto sul pannello di trattamento degli adulti dell'NCEP (ATP III) [10]:

Frazione	Range	Stato
HDL-C	≥ 40 mg/dl	Rischio ridotto a livelli superiori
	< 40 mg/dl	Rischio maggiore
LDL-C	≤ 100 mg/dl	Ottimale per pazienti affetti da malattia cardio-coronarica
	< 130 mg/dl	Auspicabile
	130 - 159 mg/dl	Rischio elevato borderline
	≥ 160 mg/dl	Rischio elevato

LDL-C comprende tutte le particelle lipoproteiche con d > 1,006 a 1,063 kg/l, come ad esempio residui VLDL, IDL, Lp(a) e LDL [2]. Queste particelle corrispondono alla somma delle bande intermedie e delle sottofrazioni LDL risolte dal sistema Lipoprint.

Colesterolo delle sottofrazioni

I valori normali attesi per le singole sottofrazioni sul sistema Lipoprint sono state stabilite come segue: sono stati ammessi N = 273 soggetti autodichiaratisi sani (di età compresa tra 18 e 85 anni, 166 donne e 107 uomini, 47% di razza bianca, 18% ispanica, 16% asiatica, 5% nera e 14% non dichiarata). A questi volontari è stato chiesto di rimanere a digiuno per 12 ore. È stato prelevato sangue intero tramite venopuntura e conservato in una provetta per siero. I campioni di siero sono stati quindi usati per verificare i parametri dei lipidi indicati e per generare profili lipoproteici con il sistema Lipoprint LDL.

I criteri per l'esclusione comprendevano diabete, assunzione di farmaci di riduzione dei lipidi ed eventi recenti di attacco cardiaco. Sono state inoltre escluse dallo studio le donne incinte dato il cambiamento dello stato lipidico che si verifica durante la gravidanza [12].

Per determinare i valori attesi sono stati usati solo i campioni corrispondenti alle linee guida NCEP (ATP III) per lo stato lipidico auspicabile [10], vale a dire TC < 200 mg/dl, LDL < 130 mg/dl, HDL > 40 mg/dl e trigliceridi < 150 mg/dl. Sono stati usati N = 114 campioni normali (di soggetti di età compresa tra 18 e 84 anni, 32% uomini e 68% donne), per stabilire i valori normali attesi definiti come un intervallo di confidenza del 95% (SD media ± 2) per ciascun parametro dello stato lipidico ottenuto sul sistema Lipoprint LDL (Tabella 1).

Tabella 1. Popolazione normale

		Colesterolo bande intermedie			Colesterolo delle sottofrazioni LDL					
	VLDL (mg/dl)	C Interm. (mg/dl)	B Interm. (mg/dl)	A Interm. (mg/dl)	LDL-1 (mg/dl)	LDL-2 (mg/dl)	LDL-3 (mg/dl)	Total LDL (mg/dl)	HDL (mg/dl)	TC (mg/dl)
Range	6 - 26	9 - 24	5 - 17	6 - 26	24 - 59	4 - 32	0 - 4	59 - 128	40 - 103	123 - 199
Media	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% Range	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

* Numero di campioni che mostrano le rispettive frazioni.

Si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca il proprio range normale, che può essere esclusivo della popolazione di riferimento, a seconda dei pazienti, di fattori geografici o ambientali.

I dati per la popolazione al di fuori del gruppo NCEP, N = 141 (di età compresa tra 18 e 77 anni, 46% uomini e 54% donne) sono riportati nella Tabella 2.

Tabella 2. Popolazione al di fuori delle linee guida NCEP

		Colesterolo bande intermedie			Colesterolo delle sottofrazioni LDL							
	VLDL (mg/dl)	C Interm. (mg/dl)	B. Interm. (mg/dl)	A. Interm. (mg/dl)	LDL-1 (mg/dl)	LDL-2 (mg/dl)	LDL-3 (mg/dl)	LDL-4 (mg/dl)	LDL-5 (mg/dl)	Total LDL (mg/dl)	HDL (mg/dl)	TC (mg/dl)
Range	5 - 69	9 - 40	5 - 37	5 - 34	9 - 77	7 - 55	0 - 35	0 - 28	0 - 11	58 - 215	26 - 137	104 - 319
Media	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% Range	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

* Numero di campioni che mostrano le rispettive frazioni.

CARATTERISTICHE SPECIFICHE DEL TEST

Precisione

Sono stati analizzati quattro campioni per determinare la variabilità intra-dosaggio e inter-dosaggio. Sono stati selezionati campioni HDL-C e LDL-C basso, medio e alto:
Campione 1: LDL-C basso, HDL-C alto e schema LDL omogeneo (solo LDL-1 e 2)
Campione 2: LDL-C medio, HDL-C medio e schema LDL leggermente disperso (LDL-1, 2, 3)
Campione 3: LDL alto, HDL basso e schema LDL disperso (LDL-1, 2, 3 e 4)
Campione 4: LDL alto, HDL-C intermedio e schema LDL disperso (da LDL-1 a 7)

Precisione intra-dosaggio

I campioni sono stati analizzati in repliche di 12 (la capacità massima della camera per elettroforesi). I risultati di precisione per HDL-C, LDL-C (somma delle bande intermedie C, B, A e delle sottofrazioni LDL) e VLDL-C sono riportati nella Tabella 3.

Tabella 3. Dati sulla precisione intra-dosaggio per **HDL, LDL** e **VLDL**

Campione	N	HDL-C Media (mg/dl)	SD	CV (%)	LDL-C Media (mg/dl)	SD	CV (%)	VLDL-C Media (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

Dati sulla precisione per le bande intermedie C, B, A e le sottofrazioni LDL 1–7 sono riportati nelle Tabelle 4 e 5.

Tabella 4. Dati sulla precisione intra-dosaggio per le sottofrazioni delle **BANDE INTERMEDIE**

Campione	N	C Interm. Media (mg/dl)	SD	CV (%)	B Interm. Media (mg/dl)	SD	CV (%)	A Interm. Media (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

Tabella 5. Dati sulla precisione intra-dosaggio per le sottofrazioni **LDL**

Campione	N	LDL-1 Media (mg/dl)	SD	CV (%)	LDL-2 Media (mg/dl)	SD	CV (%)	LDL-31 Media (mg/dl)	SD	CV (%)	LDL-4 Media (mg/dl)	SD	CV (%)
1	12	36	0,60	1,67	10	1,68	16,80	N/D	-	-	N/D	-	-
2	12	28	0,91	3,25	32	0,70	2,19	14	1,65	11,79	N/D	-	-
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

Campione	N	LDL-5 Media (mg/dl)	SD	CV (%)	LDL-6 Media (mg/dl)	SD	CV (%)	LDL-7 Media (mg/dl)	SD	CV (%)
1	12	N/D	-	-	N/D	-	-	N/D	-	-
2	12	N/D	-	-	N/D	-	-	N/D	-	-
3	12	N/D	-	-	N/D	-	-	N/D	-	-
4	12	24	0,41	1,72	16	0,72	4,62	4	0,68	17,89

Precisione inter-dosaggio

Quattro campioni sono stati analizzati in duplicato, due volte al giorno per 5 giorni, in 4 camere per elettroforesi usando un singolo lotto di provette di gel. I corrispondenti risultati di precisione per l'inter-dosaggio sono riportati nelle Tabelle 6–8.

Tabella 6. Dati sulla precisione inter-dosaggio per **HDL, LDL** e **VLDL**

Campione	N	HDL-C Media (mg/dl)	SD	CV (%)	LDL-C Media (mg/dl)	SD	CV (%)	VLDL-C Media (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

Tabella 7. Dati sulla precisione inter-dosaggio per le sottofrazioni delle **BANDE INTERMEDIE**

Campione	N	C Interm. Media (mg/dl)	SD	CV (%)	B Interm. Media (mg/dl)	SD	CV (%)	A Interm. Media (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

Tabella 8. Dati sulla precisione inter-dosaggio per le sottofrazioni **LDL**

Campione	N	LDL-1 Media (mg/dl)	SD	CV (%)	LDL-2 Media (mg/dl)	SD	CV (%)	LDL-3 Media (mg/dl)	SD	CV (%)	LDL-4 Media (mg/dl)	SD	CV (%)
1	80	41	1,61	3,92	11	1,47	13,50	N/D	-	-	N/D	-	-
2	80	37	1,43	3,86	39	1,50	3,85	14	2,69	19,21	N/D	-	-
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

Campione	N	LDL-5 Media (mg/dl)	SD	CV (%)	LDL-6 Media (mg/dl)	SD	CV (%)	LDL-7 Media (mg/dl)	SD	CV (%)
1	80	N/D	-	-	N/D	-	-	N/D	-	-
2	80	N/D	-	-	N/D	-	-	N/D	-	-
3	80	N/D	-	-	N/D	-	-	N/D	-	-
4	80	24	0,62	2,58	17	2,05	12,06	4	1,39	33,90

Linearità
Sono stati condotti studi sulla linearità con due campioni di siero fortificati con HDL-C o LDL-C isolati mediante ultracentrifugazione.

Campione 1
LDL-C: 695 mg/dl
HDL-C: 260 mg/dl
VLDL-C: 140 mg/dl

Campione 2
LDL-C: 163 mg/dl
HDL-C: 178 mg/dl
VLDL-C: 38 mg/dl

Sono state preparate diluizioni in serie usando una soluzione fisiologico a base di albumina di siero umano. Le concentrazioni osservate per l'LDL-C, l'HDL-C e il VLDL-C totali sono state confrontate ai valori attesi (Tabelle 9–11). Il recupero percentuale è stato calcolato come segue: Recupero % = (valore osservato/valore atteso) x 100.

Tabella 9. Linearità della diluizione per **LDL**

Diluizione (%)	LDL osservate (mg/dl)	LDL attese (mg/dl)	Recupero (%)
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

Diluizione (%)	LDL osservate (mg/dl)	LDL attese (mg/dl)	Recupero (%)
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

Tabella 10. Linearità della diluizione per **HDL**

Diluizione (%)	HDL osservate (mg/dl)	HDL attese (mg/dl)	Recupero (%)
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

Diluizione (%)	HDL osservate (mg/dl)	HDL attese (mg/dl)	Recupero (%)
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

Tabella 11. Linearità della diluizione per **VLDL**

Diluizione (%)	VLDL osservate (mg/dl)	VLDL attese (mg/dl)	Recupero (%)
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

Diluizione (%)	VLDL osservate (mg/dl)	VLDL attese (mg/dl)	Recupero (%)
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

Dose-Risposta

Il campione di siero A (contenente un ampio range di sottofrazioni) è stato miscelato con un pari volume di campione B (contenente principalmente LDL-2) ottenendo AB. I campioni sono stati analizzati con il sistema Lipoprint; sono state determinate le concentrazioni di colesterolo per le singole frazioni e i valori osservati sono stati confrontati con i valori attesi (Tabella 12).

Analogamente, un campione di siero A (contenente un ampio range di sottofrazioni) è stato miscelato con un pari volume di campione C (contenente principalmente LDL-1) ottenendo AC. I campioni sono stati analizzati con il sistema Lipoprint e le concentrazioni di colesterolo determinate per le singole frazioni sono state confrontate con i valori attesi (Tabella 13).

Tabella 12. Valori osservati e valori attesi per il campione miscelato AB

	A	B	AB		
	mg/dl	mg/dl	Attese (mg/dl)	Osservate (mg/dl)	Recupero (%)
VLDL	35	20	28	29	103,6
C Interm.	37	20	29	28	97,6
B Interm.	35	15	25	21	84,0
A Interm.	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

Tabella 13. Valori osservati e valori attesi per il campione miscelato AC

	A	C	AC		
	mg/dl	mg/dl	Attese (mg/dl)	Osservate (mg/dl)	Recupero (%)
VLDL	35	13	24	25	104,2
C Interm.	37	16	27	25	92,6
B Interm.	35	11	23	18	78,3
A Interm.	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

Sensibilità

La sensibilità del sistema Lipoprint è stata definita come la concentrazione minima di HDL-C e l'LDL-C totale che è possibile ottenere in maniera affidabile. È stata determinata come l'intersezione dell'intervallo di confidenza del 95% più basso della media con l'asse x quando si traccia una serie di diluizioni di valori attesi rispetto ai valori effettivi per i singoli parametri lipoproteici: la sensibilità VLDL è ≥ 2,02 mg/dl, la sensibilità HDL è ≥ 3,65 mg/dl e la sensibilità LDL totale è ≥ 8,30 mg/dl.

Interferenze

Sostanze potenzialmente interferenti sono stati iniettate nei campioni di siero alle concentrazioni riportate nella Tabella 14 e analizzate successivamente con campioni non compromessi (4 repliche). È stato riscontrato che l'emoglobina a concentrazioni superiori a 200 mg/dl e l'eparina alle concentrazioni tipiche presenti nelle provette per il prelievo di plasma eparinato interferiscono con il test Lipoprint.

Tabella 14. Interferenze

Sostanza interferente	Conc. (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	Recupero (%)	LDL-C (mg/dl)	Recupero (%)	HDL-C (mg/dl)	Recupero (%)
Nessuna	-	17±1,1	100	115±1,9	100	42±2,4	100
Bilirubina	20	15±0,9	89	115±2,2	100	45±1,6	107
Emoglobina	500	28±0,3	165	106±2,0	92	40±2,0	95
Emoglobina	200	18±0,2	106	116±0,7	101	40±0,6	95
Niacina	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
Eparina	14 U/ml	20±0,4	118	113±1,4	98	41±1,9	98

Confronto tra siero e plasma
I campioni di siero e plasma EDTA di 37 pazienti sono stati confrontati sul sistema Lipoprint. I valori del colesterolo (mg/dl) di tutte le frazioni e sottofrazioni lipoproteiche (N = 322), massimo 12 per campione, generati dal sistema Lipoprint sono stati organizzati in forma grafica e messi in correlazion:

$$\text{Colesterolo}_{plasma} = 0{,}995\ (\text{Colesterolo}_{siero}) + 1{,}158 \qquad (r^2 = 0{,}971)$$

Stabilità dei campioni
I campioni di siero (N = 22) a differenti concentrazioni di colesterolo e contenenti 7–12 frazioni e sottofrazioni sono stati conservati in frigorifero per 7 giorni. I profili Lipoprint per tutti i campioni sono stati generati il giorno 3 e il giorno 7 e i valori di colesterolo di tutte le frazioni e sottofrazioni lipoproteiche (N = 206) ottenuti sono stati confrontati:

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

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

Si è giunti alla conclusione che il siero e il plasma EDTA sono ugualmente idonei come campioni e che i campioni possono essere refrigerati (a 2–8 °C) per massimo 7 giorni.

Accuratezza per correlazione
Il sistema di analisi Lipoprint è stato confrontato con un metodo "HDL diretto" (EQUAL Diagnostics HDL Direct Liquid Select) e con un metodo "LDL diretto" (EQUAL Diagnostics LDL Direct Liquid Select). È stata valutata una popolazione di 268 campioni di siero con l'LDL-C compreso tra 55–218 mg/dl (Lipoprint) e 54–215 mg/dl (LDL Direct) e l'HDL-C compreso tra 24–129 mg/dl (Lipoprint) e 26–137 mg/dl (HDL Direct) (Tabelle 15 e 16).

Tabella 15.

	Lipoprint HDL	Direct HDL
N	268	268
Media (mg/dl)	53,2	54,8
SD (mg/dl)	15,13	15,43
Regressione	Lipoprint HDL = 0,9361 (HDL_{direct}) + 1,8607	
r^2	0,912	

Tabella 16.

	Lipoprint LDL	Direct LDL
N	268	268
Media (mg/dl)	121,9	116,3
SD (mg/dl)	30,73	29,58
Regressione	Lipoprint LDL = 0,998 (LDL_{direct}) + 5,7995	
r^2	0,923	

Un confronto simile è stato eseguito tra l'ultracentrifugazione (Quantificazione ß) e il sistema Lipoprint LDL. È stata valutata una popolazione di 40 campioni di siero con l'LDL-C compreso tra 66–211 mg/dl (Lipoprint) e 68–218 mg/dl (Quantificazione ß), l'HDL-C compreso tra 29–91 mg/dl (Lipoprint) e 28–90 mg/dl (Quantificazione ß) e il VLD-C compreso tra 9,5–49 mg/dl (Lipoprint) e 6–57 mg/dl (Quantificazione ß) (Tabelle 17–19).

Tabella 17.

	Lipoprint LDL	ß-Quant LDL
N	40	40
Media (mg/dl)	130,8	130,0
SD (mg/dl)	30,14	30,42
Regressione	Lipoprint LDL = 0,933 ($LDL_{ß\text{-}Quant}$) + 9,430	
r^2	0,887	

Tabella 18.

	Lipoprint HDL	ß-Quant HDL
N	40	40
Media (mg/dl)	53,5	53,5
SD (mg/dl)	15,29	15,71
Regressione	Lipoprint HDL = 0,944 ($HDL_{ß\text{-}Quant}$) + 3,030	
r^2	0,941	

Tabella 19.

	Lipoprint VLDL	ß-Quant VLDL
N	40	40
Media (mg/dl)	24,7	22,9
SD (mg/dl)	10,34	12,61
Regressione	Lipoprint VLDL = 0,689 ($VLDL_{ß\text{-}Quant}$) + 7,990	
r^2	0,8216	

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

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 Endocrin. Metab* 1997; 82: 2483-2491.

SUPPORTO TECNICO

- Telefono: +1.310.536.0006
- Fax: +1.310.536.0323
- E-mail: lipoprint@quantimetrix.com
- Sito Web: www.quantimetrix.com