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

Español

APLICACIÓN E INDICACIONES DE USO

El kit de subfracciones de LDL del sistema Lipoprint de Quantimetrix, “Kit Lipoprint LDL”, es un dispositivo para la medición del colesterol lipoproteínico (para fracciones y subfracciones de lipoproteínas de VLDL a HDL) en suero y plasma en ayunas, con una concentración de colesterol total (TC) >100 mg/dl. Las mediciones del colesterol lipoproteínico se utilizan como ayuda para la evaluación de trastornos de metabolismo de lípidos, junto con otros ensayos de lípidos, valoraciones de riesgos de los pacientes y evaluaciones clínicas.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL ANÁLISIS

Las lipoproteínas de plasma son partículas esféricas responsables de transportar el colesterol, los triglicéridos y los fosfolípidos. Existen cinco tipos principales de lipoproteínas: quilomicrones, lipoproteínas de densidad muy baja (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de densidad baja (LDL) y lipoproteínas de densidad alta (HDL). El colesterol HDL bajo es un fuerte predictor independiente de cardiopatía coronaria (CHD) [1]. El colesterol LDL elevado (LDL-C) ha sido identificado como uno de los mayores factores de riesgo de CHD [2]. Se sabe que los tipos de lipoproteínas son heterogéneos y constan de muchas subfracciones que varían con respecto al tamaño de las partículas, densidad y composición química. La heterogeneidad de las lipoproteínas ha sido demostrada mediante varios métodos analíticos, tales como la ultracentrifugación en gradiente de densidad [3], la resonancia magnética nuclear (RMN) [4], la electroforesis en geles desnaturalizantes en gradiente (GGE) [5] y el sistema Lipoprint, un sistema lineal de electroforesis en geles de poliacrilamida [6].

Con el sistema Lipoprint, el LDL puede resolverse en un máximo de siete subfracciones de LDL, que han sido denominadas LDL-1 (partículas más grandes) hasta LDL-7 (partículas más pequeñas).

Los factores genéticos y medioambientales son los responsables de las diferencias en el grado de heterogeneidad de LDL entre sujetos. Se sabe que la edad, el género y el estado de los lípidos afectan al perfil de la subfracción de LDL [7]. Los individuos que presentan perfiles de lipoproteínas, consistentes principalmente en las subfracciones más grandes y boyantes (LDL-1 y LDL-2), han sido designados como **Patrón A**, mientras que aquéllos con perfiles de subfracciones predominantemente más pequeñas y más densas (de LDL-3 a LDL-7) han sido designados como **Patrón B** [5] (Fig. 1).

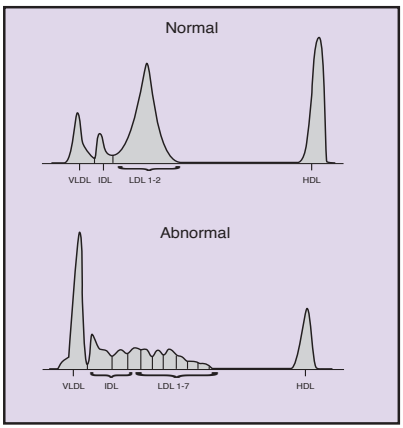

Figura 1. Perfiles de lipoproteínas normales (Patrón A) y anormales (Patrón B)

En un estudio de 109 pacientes con infarto de miocardio (IM), Austin y cols. [5] demostraron que el Patrón B de la subfracción de LDL estaba asociado con el riesgo tres veces mayor de IM, independientemente del género, la edad y el peso relativo. Krauss [8] demostro de descubrimientos similares. Rajman y cols. [6] también informaron del factor de riesgo asociado con las fracciones de lipoproteínas de baja densidad en hombres normotrigliceridémicos.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El kit Lipoprint LDL consiste de:

- Gel de poliacrilamida lineal preformado (gel apilador y gel separador) en un tubo de vidrio (Fig. 2)
- Gel cargador de líquido con un colorante lipofílico
- Sales búfer

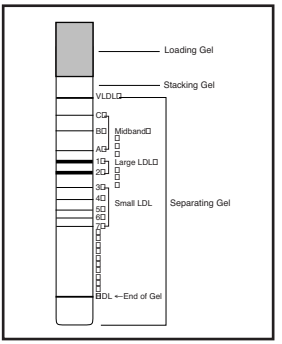

Figura 2. Esquema del tubo de gel Lipoprint

El colorante se une proporcionalmente a la cantidad relativa de colesterol en cada lipoproteína [9]. Las lipoproteínas preteñidas seguidamente se someten a electroforesis. Durante la primera fase de la electroforesis, las partículas de lipoproteínas se concentran mediante el gel cargador y el gel apilador en una banda estrecha y nítida. A medida que las lipoproteínas migran a través de la matriz del gel separador, se resuelven en bandas de lipoproteínas según el tamaño de las partículas, de las más grandes a las más pequeñas, debido a la acción de cribado del gel:las HDL migran más lejos, seguidas de las LDL pequeñas y densas, las LDL grandes y más ligeras, las bandas intermedias (que incluyen principalmente las IDL) y las VLDL. Los quilomicrones, si los hay, aparecerán por encima del gel apilador o permanecerán en el gel cargador.

Un perfil Lipoprint típico consta de 1 banda de VLDL, 3 bandas intermedias, hasta 7 bandas de LDL, y 1 banda de HDL. Una vez terminada la electroforesis, las diversas fracciones de lipoproteínas teñidas (bandas) presentes en la muestra, serán identificadas por su movilidad (Rf) utilizando las VLDL como el punto de referencia de inicio (VLDL = 0) y las HDL como el punto de referencia principal (HDL = 1) (Fig. 3).

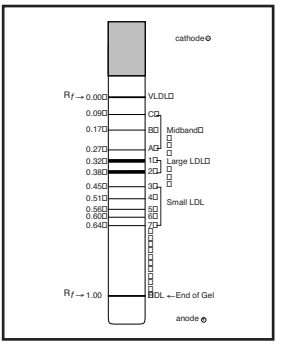

Figura 3. Movilidad de las bandas de lipoproteínas

Se determina el área relativa para cada banda de lipoproteínas y se multiplica por la concentración total del colesterol de la muestra para calcular la cantidad de colesterol de cada banda en mg/dl. La concentración total de colesterol de la muestra debe ser medida independientemente, p.ej., con un analizador clínico o un instrumento portátil.

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

El kit Lipoprint LDL consta de tubos de gel de poliacrilamida de alta resolución preformado, una solución de gel cargador con colorante lipofílico y sales búfer.

Reactivos y materiales (suministrados, véase el número de catálogo 48-7002 de Quantimetrix)
Un kit de 100 ensayos consiste de:

1. Tubos de gel Lipoprint LDL — 100 tubos
   Poliacrilamida, búfer, conservante
2. Gel cargador Lipoprint LDL — 24 ml
   Acrilamida
   N, N-metilenobisacrilamida
   Colorante lipofílico
   Catalizador
   Estabilizante
   Búfer
3. Sales búfer Lipoprint LDL — 6 viales
   Tris (hidroximetil) aminometano
   Ácido bórico
4. Prospecto del producto Lipoprint LDL — 1 en cada kit

Sistema Lipoprint (no suministrado, véase el número de catálogo 48-9150/9152 de Quantimetrix)

1. Ordenador (incluye el programa de análisis LipoWare)
2. Impresora en color
3. Escáner digital
4. Cámara de electroforesis
5. Fuente de alimentación (120 V/220 V)
6. Gradilla de preparación
7. Luz de preparación
8. Aguja de utilidad

Liposure – Control de lipoproteínas (no suministrado, véanse los números de catálogo 48-7060 – Nivel 1) de Quantimetrix**)**

Material necesario (no suministrados)

1. Agua destilada o desionizada
2. Pipeteador automático de 25 µl
3. Pipeteador automático de 200 µl
4. Mezclador magnético
5. Parafilm™
6. Cilindros graduados

Reconstitución de los reactivos

La solución búfer electrolítica se reconstituye disolviendo un vial de sales búfer del kit Lipoprint LDL en 1.200 ml de agua destilada o desionizada.

Almacenamiento y estabilidad

Los tubos de gel, el gel cargador y las sales búfer deben almacenarse a 2–8 C. **No congelar**. Con un almacenamiento correcto, los reactivos, abiertos o sin abrir, son estables hasta la fecha de caducidad.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Sólo para uso diagnóstico *in vitro*

- Utilizar siempre el kit Lipoprint LDL de acuerdo con las instrucciones indicadas en el prospecto del Lipoprint.
- La solución de gel cargador contiene acrilamida, que es tóxica cuando entra en contacto con la piel o en caso de ingestión. Evitar la inhalación y la exposición prolongada a la solución de gel cargador.
- El gel cargador es fotosensible y está envasado en un frasco de vidrio ámbar.
- Evitar pipetear con la boca y el contacto físico con los reactivos o las muestras.
- Todas las muestras, reactivos y controles deben tratarse como potencialmente infecciosos en caso de ingestión o de absorción por contacto prolongado con la piel. Deben tomarse en todo momento las precauciones establecidas en su centro para la manipulación y desecho de materiales.

MUESTRAS Y RECOGIDA

- Sólo deben utilizarse muestras en ayunas (12 horas).
- Puede utilizarse suero o plasma con EDTA (ver p. 15).
- No utilizar heparina como anticoagulante.
- Las muestras pueden guardarse hasta 7 días a 2–8 C.
- Se recomienda no congelar las muestras. Sin embargo, si una muestra debiera ser congelada, se haria criogénicamente (a –70 C o menos).

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Prepare la solución búfer electrolítica, tal como se ha descrito, disolviendo un vial de sales búfer en 1.200 ml de agua desionizada o destilada.
2. Extraer los tubos de gel del vaso, limpiarlos y colocarlos en la gradilla de preparación, con el extremo vacío hacia arriba (Fig. 4). Evitar tocar los extremos del tubo de gel o ejercer presión en los geles, ya que ello provocaría la introducción de burbujas de aire en el gel. No utilizar el tubo de gel si contiene burbujas de aire o si el gel se sale.
3. Eliminar completamente el búfer de almacenamiento de la parte superior de los geles, invirtiendo la gradilla y sacudiéndola. Si es necesario, invertir los tubos y secar su extremo para eliminar el exceso de búfer del interior de los mismos.
4. Aplique 25 µl de muestra a cada tubo (Fig. 4).

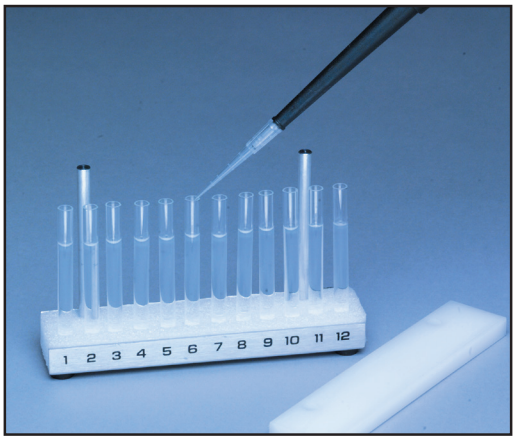

Figure 4. Aplicación de la muestra

5. Añadir 200 µl de gel cargador Lipoprint a cada tubo.
6. Poner una tira de Parafilm entre los tubos de gel y la tapa de la gradilla de preparación para evitar la contaminación. Mezclar el gel cargador con la muestra, invirtiendo la gradilla de preparación varias veces (Fig. 5).

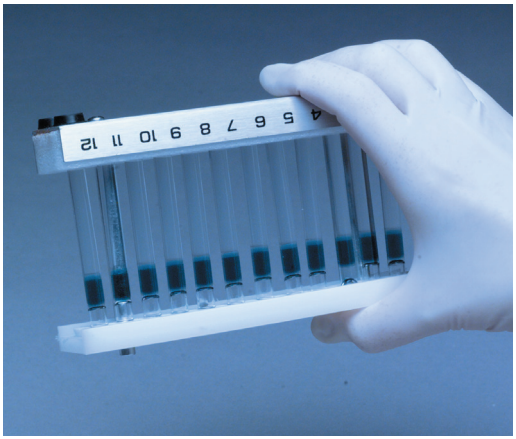

Figura 5. Mezcla del gel cargador y de las muestras

7. Colocar la luz de preparación verticalmente con la bombilla en la parte superior. Colocar la gradilla de preparación cargada de forma que el gel cargador toque la bombilla (Fig. 6). Fotopolimerizar los geles cargadores durante 30 minutos (pero no más de 40).

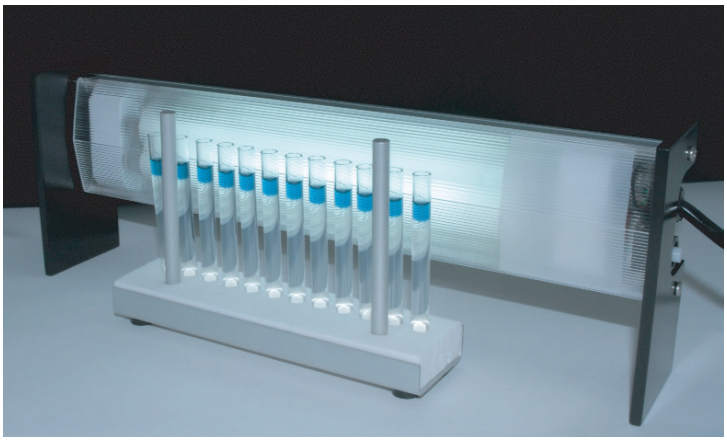

Figure 6. Fotopolimerización

8. Una vez terminada la fotopolimerización, extraer los tubos de gel de la gradilla de preparación y colocarlos en el adaptador de silicona de la cámara de arriba. Sujetando el tubo de gel por el lado, empujarlo hasta que el extremo del tubo del gel cargador entre en ligero contacto con la parte de arriba del adaptador. La inserción resulta más fácil si se humedece la parte de arriba del tubo de gel. Evitar tocar cualquiera de los extremos del tubo durante este paso. Si se procesa menos de la capacidad total de la cámara, cubrir los adaptadores vacíos con los tubos de vidrio pequeños que se suministran para este fin. Empujar los tubos desde la parte superior hasta que entren en ligero contacto con el extremo inferior del adaptador (Fig. 7).

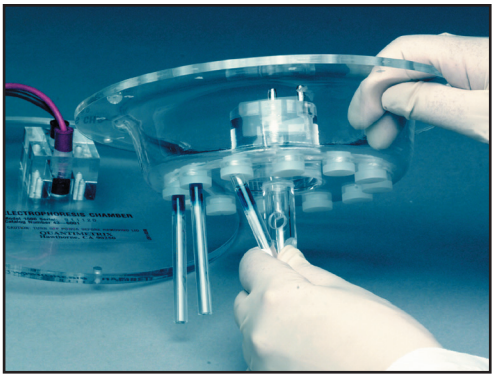

Figure 7. Carga de los tubos

9. Colocar 1.000 ml de solución de búfer electrolítica en la cámara de abato y 200 ml en la cámara de arriba. El búfer inferior puede volver a utilizarse hasta cinco veces. **Utilizar siempre búfer fresco en la cámara de arriba.** El búfer debe estar a temperatura ambiental (TA: 18–27 C).
10. Cuando ambas cámaras estén unidas y llenas de búfer, examinar atentamente cada uno de los tubos para comprobar que no contengan burbujas. Si fuera necesario, eliminar las burbujas con la punta de un pipeteador. Las burbujas pueden obstruir el paso de la corriente eléctrica.
11. Tapar la cámara de electroforesis y conectarla a la fuente de electricidad (Fig. 8). Ajustar la fuente de electricidad para que suministre una corriente de **3 mA por cada tubo de gel** (p.ej., 36 mA para 12 tubos, 18 mA para 6 tubos etc.). El voltaje debe de estar puesto a un suministro máximo (500 V).

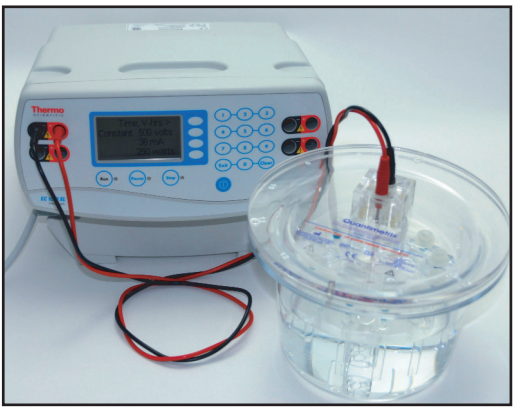

Figure 8. Cámara acoplada

12. La electroforesis dura aproximadamente 60 minutos. Detener la electroforesis cuando la fracción de HDL esté a aproximadamente 1 cm del fondo del tubo del gel de migración más rápida.
13. Una vez terminada la electroforesis, apagar la corriente, quitar la tapa de la cámara y desechar el búfer electrolítico de la cámara superior. El búfer inferior puede guardarse y volver a utilizarse hasta 5 veces. Desecharlo tras 7 días.
14. Antes de retirar los tubos de gel de la cámara de electroforesis, limpiar el exceso de búfer, y colocar los tubos en la gradilla de preparación para transportarlos al escáner para analizarlos. Permita que los tubos de gel reposen durante al menos 30 minutos, pero no más de 2 horas, antes de efectuar la exploración.

Nota sobre el procedimiento: *Durante la electroforesis puede producirse una distorsión de la superficie del gel separador y la banda VLDL. La distorsión se corrige cuando se extraen los geles de la cámara de electroforesis, introduciendo con cuidado la aguja de utilidad desde la parte superior del gel cargador y a lo largo del cristal. Con un movimiento circular, realizar un corte en la superficie del gel separador. Éste recuperará su forma normal. Evitar desplazar el gel cargador al retirar la herramienta. Si el gel se desplazara, llene el vacío con agua desionizada o destilada.*

CONTROL DE CALIDAD

La fiabilidad de los resultados del ensayo debe monitorizarse regularmente con material de control que emule razonablemente el rendimiento de las muestras de paciente. Se recomienda el uso de material de control de calidad en cada proceso de muestras de paciente. Los materiales de control sólo sirven para monitorizar la exactitud y la precisión. La recuperación de los valores de control dentro de los rangos adecuados debe ser el criterio prevalente a la hora de validar el rendimiento del análisis.

El control de calidad debe realizarse de acuerdo con las leyes locales, estatales y federales, o con los requisitos de acreditación. Quantimetrix Corporation dispone de Liposure, que es el material de control de calidad adecuado.

RESULTADOS CUALITATIVOS

Nota: *Las diferentes bandas de un perfil Lipoprint pueden identificarse utilizando la plantilla Lipoprint para realizar una evaluación cualitativa (distribución de LDL homogénea frente a distribución heterogénea).*

El perfil de lipoproteínas refleja el estado de los lípidos de la muestra de paciente (Fig. 9). Un perfil de lipoproteínas normal (Patrón A) presentará habitualmente bandas de VLDL; bandas intermedias C, B y A (que incluyen IDL); LDL-1 y 2, y HDL. La presencia de subfracciones de LDL adicionales (de LDL-3 a 7) es indicativo de LDL heterogéneo (es decir, Patrón B).

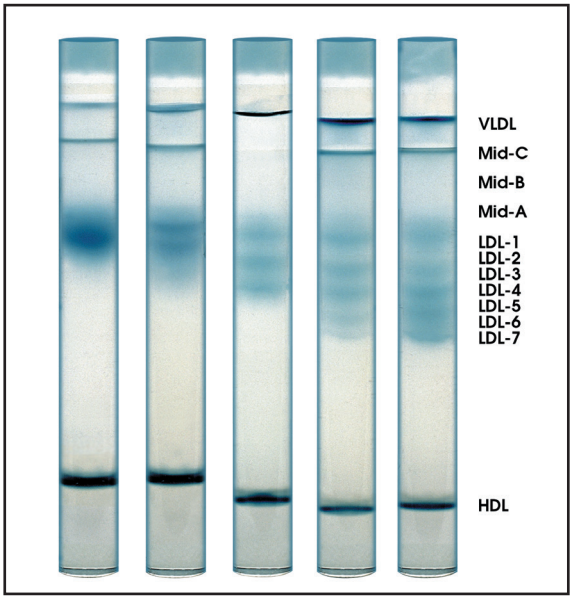

Figura 9. Distribuciones de la subfracción de lipoproteínas de cinco individuos, desde un patrón LDL homogéneo a la izquierda, hasta un patrón progresivamente más heterogéneo a la derecha.

Uso de la plantilla Lipoprin
La plantilla del sistema Lipoprint LDL se utiliza para identificar las subfracciones de lipoproteínas presentes en el gel (Fig. 10).

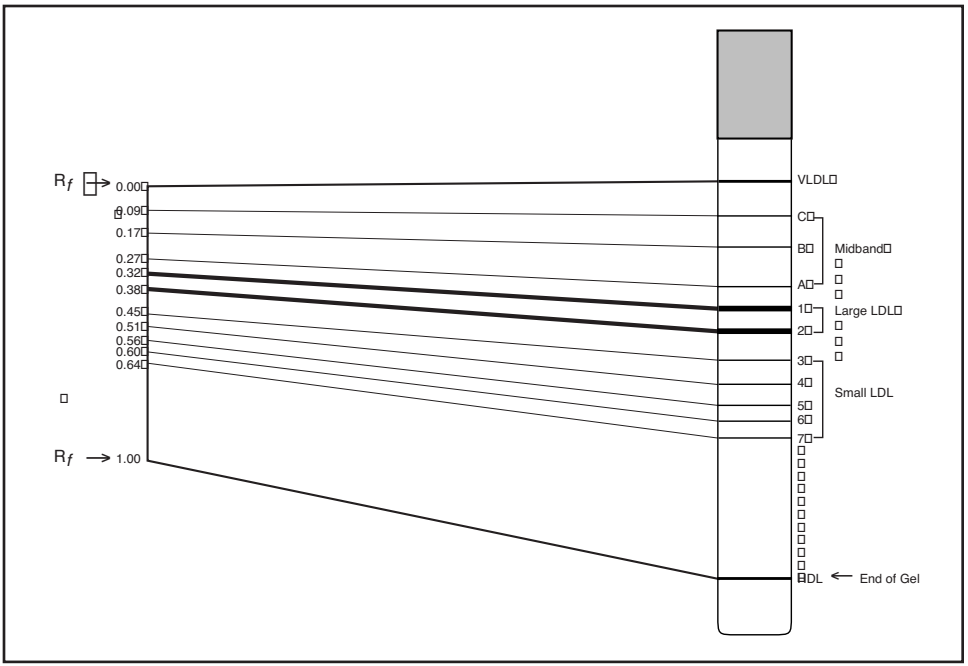

Figura 10. Plantilla de las subfracciones de LDL del sistema Lipoprint

1. Marcar el centro de cada una de las bandas de lipoproteínas presentes, con un rotulador, en el tubo de vidrio.
2. Alinear la fracción VLDL en la parte superior del gel separador con la línea de la plantilla marcada “VLDL”.
3. Deslizar el gel por la plantilla hasta que la banda de HDL se superponga con la línea marcada “HDL”.
4. Determinar las subfracciones de lipoproteínas presentes en la muestra, haciendo coincidir las bandas del gel con las líneas correspondientes de la plantilla.

RESULTADOS CUANTITATIVOS
Nota: *Antes de generar los resultados cuantitativos debe obtenerse un valor de colesterol total para cada muestra que se va a analizar, utilizando un método para colesterol clínicamente aprobado.* ***La concentración de colesterol total de la muestra debe ser >100 mg/dl.***

Se escudrine los tubos de gel y se establece el área relativa de cada subfracción de lipoproteínas trazando líneas verticales a intervalos de corte predeterminados para cada banda. La cantidad de colesterol en cada banda de lipoproteínas se calcula multiplicando el área relativa de cada banda por el colesterol total de la muestra. El colesterol de LDL se calcula como la suma de las concentraciones de colesterol de todas las subfracciones de LDL más las bandas intermedias A, B y C.

Tradicionalmente, los perfiles de las subfracciones de lipoproteínas han sido clasificados como Tipo A (normal) y Tipo B (anormal) basándose en el tamaño promedio de las partículas de las LDL [5]. Un perfil Lipoprint normal con LDL (LDL-1 y LDL-2) predominantemente grandes, es coherente con el Tipo A (Fig. 11).

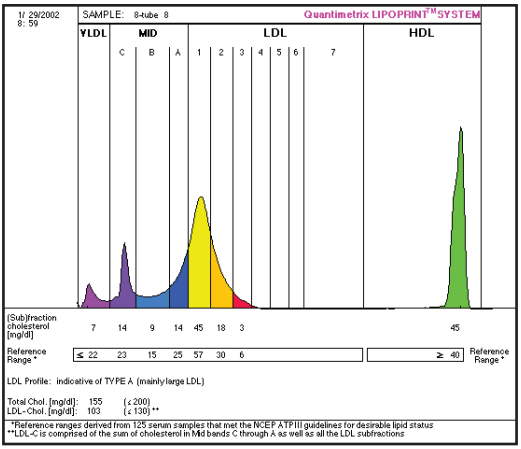

Figura 11. Perfil Lipoprint normal típico

Asimismo, un perfil Lipoprint anormal con LDL (de LDL-3 a LDL-7) predominantemente pequeñas, es coherente con el Tipo B, según se describe en la literatura (Fig. 12).

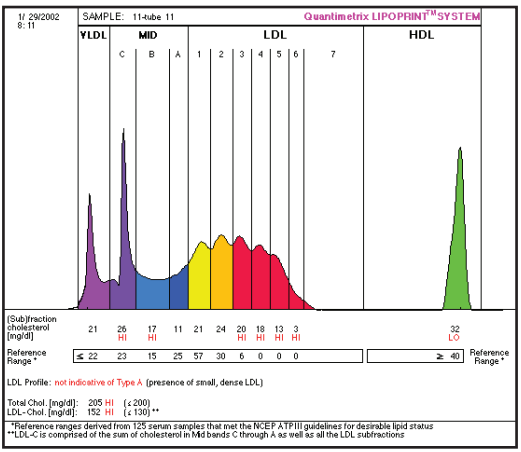

Figura 12. Perfil Lipoprint anormal típico

LIMITACIONES

- El ensayo Lipoprint LDL debe utilizarse junto con otros datos (p.ej., pruebas clínicas adicionales, observaciones del médico, historial familiar, etc.)
- La heparina interfiere con la separación de las subfracciones de LDL.
- El colesterol total de la muestra debe ser superior a 100 mg/dl para evitar una estimación excesiva del colesterol VLDL.
- Los quilomicrones de la muestra invalidarán la medición del colesterol de la subfracción. El aspecto de la muestra (es decir, falta de transparencia, turbidez o una capa cremosa en su superficie) tras la refrigeración nocturna debe servir como prueba confirmatoria de la presencia de quilomicrones.
- No se han evaluado los resultados de Lipoprint para ensayos de lipoproteínas durante el embarazo.
- El programa nacional de educación sobre el colesterol (NCEP) de EE.UU. no ha publicado directrices sobre los valores óptimos o deseables para las subfracciones de LDL.

VALORES ESPERADOS

HDL-C y LDL-C

El programa nacional de educación sobre el colesterol (NCEP) de EE.UU. ha establecido los puntos de referencia de riesgos para el colesterol LDL y HDL. Estos puntos de referencia fueron confirmados en mayo de 2001 en el tercer informe sobre el ATP III (Adult Treatment Panel) del NCEP [10]:

Fracción	Intervalo	Estado
HDL-C	≥ 40 mg/dl	Menor riesgo a niveles más altos
	< 40 mg/dl	Mayor riesgo
LDL-C	≤ 100 mg/dl	Óptimo para pacientes con cardiopatía coronaria (CHD)
	< 130 mg/dl	Deseable
	130 - 159 mg/dl	En el límite de alto riesgo
	≥ 160 mg/dl	Alto riesgo

LDL-C incluye todas las partículas de lipoproteínas con d > 1,006 a 1,063 kg/l, tales como restos de VLDL, IDL, Lp(a) y LDL [2]. Estas partículas corresponden a la suma de las midbands (bandas intermedias) y subfracciones de LDL resueltas por el sistema Lipoprint.

Colesterol de subfracción

Los valores normales esperados para las subfracciones individuales en el sistema Lipoprint, se establecieron de la siguiente forma: se reclutaron individuos autodeclarados sanos, N = 273 (entre 18 y 85 años, 166 mujeres y 107 hombres, 47 % caucásicos, 18 % hispánicos, 16 % asiáticos, 5 % negros y 14 % sin definir). Estos voluntarios debieron ayunar durante 12 horas. Se recogió sangre total en un tubo de suero mediante venipunción. Las muestras de suero se utilizaron para comprobar los parámetros de lípidos indicados y generar los perfiles de lipoproteínas con el sistema Lipoprint LDL.

Se excluyó del estudio a los diabéticos, a los que tomaban medicación para reducción de lípidos, y a aquéllos que habían sufrido ataques cardíacos recientes. También se excluyó a las mujeres embarazadas debido al cambio de estado de los lípidos [12].

Sólo se utilizaron muestras cuyo estado de lípidos [10] cumplía con las directrices del NCEP (ATP III), es decir, TC < 200 mg/dl, LDL < 130 mg/dl, HDL > 40 mg/dl y triglicéridos < 150 mg/dl, para determinar los valores esperados. Las muestras normales, N = 114 (entre 18 y 84 años, 32 % hombres y 68 % mujeres) se utilizaron para establecer los valores esperados normales, definidos con un intervalo de confianza del 95 % (DT media ± 2) para cada parámetro de lípidos, según resultados del sistema Lipoprint LDL (Tabla 1).

Tabla 1. Población normal

		Colesterol de bande intermedia			Colesterol de subfracción LDL					
	VLDL (mg/dl)	Banda I. C (mg/dl)	Banda I. B (mg/dl)	Banda I. A (mg/dl)	LDL-1 (mg/dl)	LDL-2 (mg/dl)	LDL-3 (mg/dl)	LDL Total (mg/dl)	HDL (mg/dl)	TC (mg/dl)
Intervalo	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
DT	4,12	2,82	2,40	4,26	7,85	6,82	0,81	16,56	11,29	18,45
Intervalo 95%	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

* Número de muestras que indican las fracciones respectivas.

Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio intervalo normal, que puede ser exclusivo de la población a la que atiende, según factores geográficos, humanos o medioambientales.

Los datos para la población fuera del grupo NCEP, N = 141 (entre 18 y 77 años, 46 % hombres y 54 % mujeres) se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Población ajena a las directrices del NCEP

		Colesterol de bande intermedia			Colesterol de subfracción LDL							
	VLDL (mg/dl)	Banda I. C (mg/dl)	Banda I. B (mg/dl)	Banda I. A (mg/dl)	LDL-1 (mg/dl)	LDL-2 (mg/dl)	LDL-3 (mg/dl)	LDL-4 (mg/dl)	LDL-5 (mg/dl)	LDL total (mg/dl)	HDL (mg/dl)	TC (mg/dl)
intervalo	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
DT	13,50	5,65	5,21	6,14	15,13	10,98	7,50	6,05	3,6	27,17	18,05	35,04
intervalo 95%	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

* Número de muestras que indican las fracciones respectivas.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE RENDIMIENTO

Precisión

Se analizaron cuatro muestras para determinar la variabilidad intraensayo e interensayos. Se seleccionaron muestras con HDL-C y LDL-C bajo, medio y alto:

Muestra 1: Patrón LDL-C bajo, HDL-C alto y LDL homogéneo (sólo LDL-1 y 2)
Muestra 2: Patrón LDL-C medio, HDL-C medio y LDL ligeramente disperso (LDL-1, 2, 3)
Muestra 3: Patrón LDL alto, HDL bajo y LDL disperso (LDL-1, 2, 3 y 4)
Muestra 4: Patrón LDL-C alto, HDL-C intermedio y LDL disperso (de LDL-1 a 7)

Precisión intraensayo

Las muestras se analizaron en replicados de 12 (la capacidad máxima de la cámara de electroforesis). Los resultados de precisión de HDL-C, LDL-C (suma de las bandas intermedias C, B, A y subfracciones de LDL) y VLDL-C se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Datos de precisión intraensayo para **HDL, LDL** y **VLDL**

Muestra	N	HDL-C Media (mg/dl)	DT	CV (%)	LDL-C Media (mg/dl)	DT	CV (%)	VLDL-C Media (mg/dl)	DT	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

Los datos de precisión de las bandas intermedias C, B, A y subfracciones de LDL 1–7 se muestran en las Tablas 4 y 5.

Tabla 4. Datos de precisión intraensayo para subfracciones de **BANDA INTERMEDIA**

Muestra	N	Banda I. C Media (mg/dl)	DT	CV (%)	Banda I. B Media (mg/dl)	DT	CV (%)	Banda I. A Media (mg/dl)	DT	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

Tabla 5. Datos de precisión intraensayo para subfracciones de **LDL**

Muestra	N	LDL-1 Media (mg/dl)	DT	CV (%)	LDL-2 Media (mg/dl)	DT	CV (%)	LDL-31 Media (mg/dl)	DT	CV (%)	LDL-4 Media (mg/dl)	DT	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

Muestra	N	LDL-5 Media (mg/dl)	DT	CV (%)	LDL-6 Media (mg/dl)	DT	CV (%)	LDL-7 Media (mg/dl)	DT	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

Precisión interensayos

Se analizaron cuatro muestras por duplicado, dos veces al día durante 5 días, en 4 cámaras de electroforesis, utilizando un solo lote de tubos de gel. Los resultados de precisión interensayos correspondientes se muestran en las Tablas 6–8.

Tabla 6. Datos de precisión interensayos para **HDL, LDL** y **VLDL**

Muestra	N	HDL-C Media (mg/dl)	DT	CV (%)	LDL-C Media (mg/dl)	DT	CV (%)	VLDL-C Media (mg/dl)	DT	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

Tabla 7. Datos de precisión interensayos para subfracciones de **BANDA INTERMEDIA**

Muestra	N	Banda I. C Media (mg/dl)	DT	CV (%)	Banda I. B Media (mg/dl)	DT	CV (%)	Banda I. A Media (mg/dl)	DT	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

Tabla 8. Datos de precisión interensayos para subfracciones de **LDL**

Muestra	N	LDL-1 Media (mg/dl)	DT	CV (%)	LDL-2 Media (mg/dl)	DT	CV (%)	LDL-3 Media (mg/dl)	DT	CV (%)	LDL-4 Media (mg/dl)	DT	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

Muestra	N	LDL-5 Media (mg/dl)	DT	CV (%)	LDL-6 Media (mg/dl)	DT	CV (%)	LDL-7 Media (mg/dl)	DT	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

Linealidad

Se llevaron a cabo estudios de linealidad con dos muestras de suero reforzadas con HDL-C o LDL-C, aisladas por ultracentrifugación.

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

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

Se prepararon diluciones en serie utilizando una solución de albúmina sérica humana fisiológica. Las concentraciones observadas para LDL-C, HDL-C y VLDL-C total se compararon con los valores esperados (Tablas 9–11). El porcentaje de recuperación se calculó de la siguiente forma: % de recuperación = (valor observado/valor esperado) x 100.

Tabla 9. Linealidad de dilución para **LDL**

Dilución (%)	LDL observda (mg/dl)	LDL esperada (mg/dl)	Recuperación (%)
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

Dilución (%)	LDL observda (mg/dl)	LDL esperada (mg/dl)	Recuperación (%)
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

Tabla 10. Linealidad de dilución para **HDL**

Dilución (%)	HDL observda (mg/dl)	HDL esperada (mg/dl)	Recuperación (%)
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

Dilución (%)	HDL observda (mg/dl)	HDL esperada (mg/dl)	Recuperación (%)
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

Tabla 11. Linealidad de dilución para **VLDL**

Dilución (%)	VLDL observda (mg/dl)	VLDL esperada (mg/dl)	Recuperación (%)
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

Dilución (%)	VLDL observda (mg/dl)	VLDL esperada (mg/dl)	Recuperación (%)
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

Respuesta a la dosis

La muestra de suero A (conteniendo una gran variedad de subfracciones) se mezcló con un volumen igual de la muestra B (conteniendo principalmente LDL-2) para obtener AB. Se analizaron las muestras con el sistema Lipoprint, se determinaron las concentraciones de colesterol de las fracciones individuales, y se compararon los valores observados con los valores esperados (Tabla 12).

De forma similar, una muestra de suero A (conteniendo una gran variedad de subfracciones) se mezcló con un volumen igual de la muestra de suero C (conteniendo principalmente LDL-1) para obtener AC. Se analizaron las muestras con el sistema Lipoprint y se determinaron las concentraciones de colesterol de las fracciones individuales, que se compararon con los valores esperados (Tabla 13).

Tabla 12. Valores observados frente a valores esperados para la muestra AB mezclada

	A	B	AB		
	mg/dl	mg/dl	Esperada (mg/dl)	Observada (mg/dl)	Recuperación (%)
VLDL	35	20	28	29	103,6
Banda I. C	37	20	29	28	97,6
Banda I. B	35	15	25	21	84,0
Banda I. 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

Tabla 13. Valores observados frente a valores esperados para la muestra AC mezclada

	A	C	AC		
	mg/dl	mg/dl	Esperada (mg/dl)	Observada (mg/dl)	Recuperación (%)
VLDL	35	13	24	25	104,2
Banda I. C	37	16	27	25	92,6
Banda I. B	35	11	23	18	78,3
Banda I. 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

Sensibilidad

La sensibilidad del sistema Lipoprint se definió como la concentración mínima de HDL-C y LDL-C total que puede ser determinada de forma fiable. Se determinó como la intersección del intervalo de confianza del 95 % más bajo de la media con el eje x, al trazar una serie de diluciones de los valores esperados frente a los valores reales de los parámetros de lipoproteínas individuales: la sensibilidad de VLDL es ≥ 2,02 mg/dl, la sensibilidad de HDL es ≥ 3,65 mg/dl, y la sensibilidad de LDL total es ≥ 8,30 mg/dl.

Interferencias

Las sustancias potencialmente interferentes fueron introducidas en muestras de suero a las concentraciones enumeradas en la Tabla 14, y luego se analizaron con las muestras no comprometidas (4 replicados). Se halló que la hemoglobina a concentraciones superiores a 200 mg/dl y la heparina a las concentraciones típicas encontradas en los tubos de recogida de plasma heparinizado, interferían con el ensayo Lipoprint.

Tabla 14. Interferencias

Interferente	Conc. (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	Recuperación (%)	LDL-C (mg/dl)	Recuperación (%)	HDL-C (mg/dl)	Recuperación (%)
Ninguno	-	17±1,1	100	115±1,9	100	42±2,4	100
Bilirrubina	20	15±0,9	89	115±2,2	100	45±1,6	107
Hemoglobina	500	28±0,3	165	106±2,0	92	40±2,0	95
Hemoglobina	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
Heparina	14 U/ml	20±0,4	118	113±1,4	98	41±1,9	98

Comparación de suero frente a plasma
Las muestras de suero y plasma con EDTA procedentes de 37 pacientes se compararon en el sistema Lipoprint. Se trazaron y correlacionaron los valores de colesterol (mg/dl) de todas las fracciones y subfracciones de lipoproteínas (N = 322), hasta un total de 12 por muestra, generados por el sistema Lipoprint:

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

Estabilidad de la muestra
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):

$$\text{Colesterol}_{día\ 3} = 0{,}996\ (\text{Colesterol}_{día\ 0}) + 0{,}075 \qquad (r^2 = 0{,}976)$$

$$\text{Colesterol}_{día\ 7} = 0{,}964\ (\text{Colesterol}_{día\ 0}) + 0{,}758 \qquad (r^2 = 0{,}961)$$

Se llegó a la conclusión de que el suero y el plasma con EDTA son igualmente adecuados como muestras, y que éstas pueden ser almacenadas en el frigorífico (2–8 C) hasta 7 días.

Precisión por correlación
El sistema de ensayo Lipoprint se comparó con un método HDL directo (EQUAL Diagnostics HDL Direct Liquid Select) y con un método LDL directo (EQUAL Diagnostics LDL Direct Liquid Select). Se evaluó una población de 268 muestras de suero con LDL-C entre 55–218 mg/dl (Lipoprint) y 54–215 mg/dl (LDL directo), y con HDL-C entre 24–129 mg/dl (Lipoprint) y 26–137 mg/dl (HDL directo) (Tablas 15 y 16).

Tabla 15.

	Lipoprint HDL	Directo HDL
N	268	268
Media (mg/dl)	53,2	54,8
DT (mg/dl)	15,3	15,43
Regresión	Lipoprint HDL = 0,9361 ($HDL_{directo}$) + 1,8607	
r^2	0,912	

Tabla 16.

	Lipoprint LDL	Directo LDL
N	268	268
Media (mg/dl)	121,9	116,3
DT (mg/dl)	30,73	29,58
Regresión	Lipoprint LDL = 0,998 ($LDL_{directo}$) + 5,7995	
r^2	0,923	

Se realizó una comparación similar entre la ultracentrifugación (cuantificación ß) y el sistema Lipoprint LDL. Se evaluó una población de 40 muestras de suero con LDL-C entre 66–211 mg/dl (Lipoprint) y 68–218 mg/dl (cuantificación ß), con HDL-C entre 29–91 mg/dl (Lipoprint) y 28–90 mg/dl (cuantificación ß), y con VLDL-C entre 9,5–49 mg/dl (Lipoprint) y 6–57 mg/dl (cuantificación ß) (Tablas 17–19).

Tabla 17.

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

Tabla 18.

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

Tabla 19.

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

BIBLIOGRAFÍA

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.

ASISTENCIA TÉCNICA

- Teléfono: +1.310.536.0006
- Fax: +1.310.536.0323
- Correo electrónico: lipoprint@quantimetrix.com
- Sitio web: www.quantimetrix.com