

CAT
Critically Appraised Topic

Bepaling van LDL-cholesterol: gemeten versus berekende waarden

Author: Dorien Van den Bossche

Supervisor: Dr. D. De Smet

Search/methodology verified by: Dr. D. De Smet

Date: 02/05/2017

CLINICAL BOTTOM LINE

Achtergrond: Een verhoogde waarde voor low-density-lipoproteïne – cholesterol (LDL-C) vormt een belangrijk risico op de ontwikkeling van cardiovasculaire ziekten (CVZ). LDL-C wordt als een primair behandelingstarget in de primaire en secundaire preventie van CVZ naar voren geschoven. Een accurate bepaling van de LDL-C is bijgevolg gewenst. Voor de bepaling van LDL-C zijn zowel directe als indirecte methoden beschikbaar. De Friedewald Formule is de meest gebruikte methode voor LDL-C in de klinische laboratoria. In deze studie wordt een overzicht gegeven van de beschikbare directe en indirecte methoden. Daarnaast wordt er een uitvoerige vergelijking weergegeven tussen beschikbare formules en een directe homogene methode.

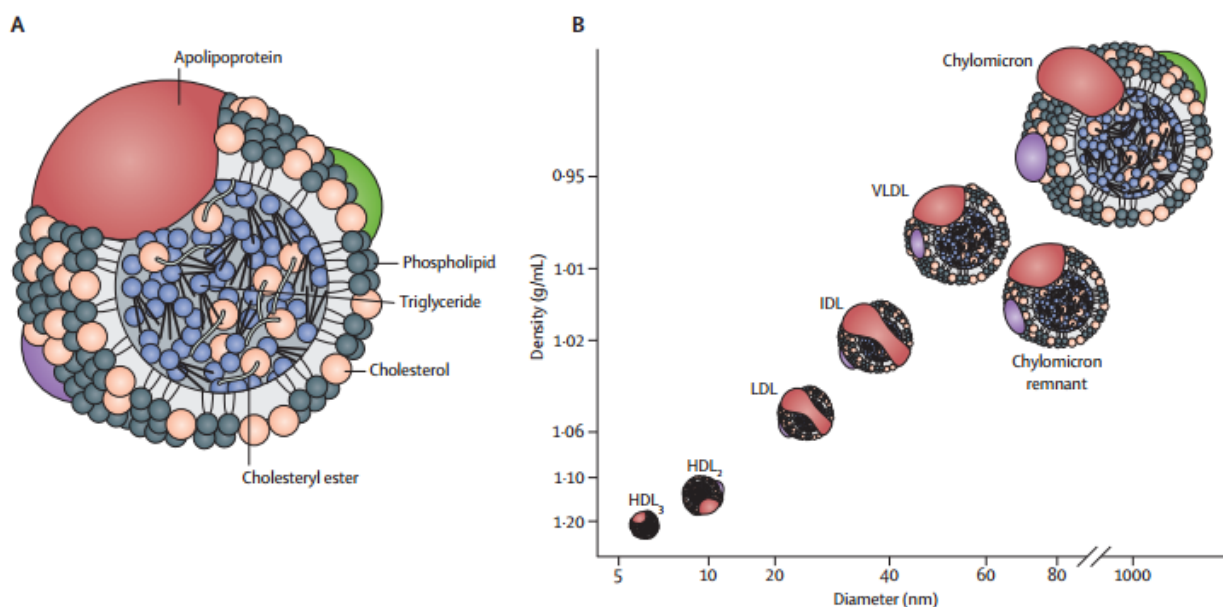
Methoden: In onze studie werden 32 218 patiënten met een triglyceriden-concentratie lager dan 400 mg/dL geïnccludeerd. In de studiecohorte (n= 28772) werd de Friedewald formule en de Anandaraja formule vergeleken met een directe homogene enzymatische colorimetrische methode voor de LDL-C bepaling. Uit de verzamelde data van de studiecohorte werd een nieuwe formule afgeleid die gevalideerd werd in een validatiecohort (n=3446).

Resultaten: De mediane waarden voor LDL-C in de studiecohorte waren 102 (IQR: 79-128) mg/dL, 98 (IQR: 74-123) mg/dL en 112 (IQR: 87 – 138) mg/dL, respectievelijk voor de directe methode (D-LDL-C), de Friedewald formule (F-LDL-C) en de Anandaraja formule (A-LDL-C). De Wilcoxon test toonde een significant verschil aan tussen de indirecte methoden en de directe methode ($P < 0,05$). Algemeen werd vastgesteld dat met de directe methode hogere concentraties voor LDL-C werd gemeten ten opzichte van de Friedewald formule. Een goede correlatie (Spearman coëfficiënt studiecohorte $r = 0,965$, $95\%CI [0,964 - 0,965]$) tussen de D-LDL-C en F-LDL-C werd vastgesteld. In een uitgebreide concordantie-analyse op basis van Europese cut-off-waarden werden afwijkingen tussen beide methoden in kaart gebracht. Bij de discordanties werd opgemerkt dat de D-LDL-C waarde steeds 1 risicocategorie hoger gecategoriseerd werd dan de F-LDL-C. Tot slot vertoonde ook de nieuwe Delta-formule een goede correlatie ten opzichte van de D-LDL-C.

Conclusie: De direct methode meet hogere LDL-C waarden in vergelijking met de Friedewald formule. Dit leidt in een aantal gevallen tot het categoriseren van de D-LDL-C-waarde in een hogere risicocategorie. Een nieuwe formule voor de bepaling van LDL-C werd voorgesteld en vervolgens gevalideerd in een validatiecohort. Deze formule vertoont een hogere concordantie met de directe methode.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Het transport van lipiden wordt in het plasma bewerkstelligd door lipoproteïnen. In de kern van deze partikels zijn hydrofobe cholesterolesters en triglyceriden opgeslagen. Zij worden omgeven door een externe laag van fosfolipiden en cholesterol. Bovendien bevat elk lipoproteïnepartikel een apolipoproteïne (Apo) dat enerzijds instaat voor de structurele integriteit van het partikel, maar daarnaast ook een rol speelt in de assemblage, de secretie en de binding van de partikels aan de receptoren. De lipoproteïnen worden traditioneel geclassificeerd volgens hun grootte en densiteit. Volgens toenemende densiteit onderscheidt men na ultracentrifugatie van het plasma: chylomicronen, very low density lipoproteïnen (VLDL), intermediate density lipoproteïnen (IDL), low density lipoproteïnen (LDL) en high density lipoproteïnen (HDL). HDL draagt als enige lipidenpartikel het Apo A1, dit in tegenstelling tot de chylomicronen, VLDL, IDL en LDL waarop een Apo B aanwezig is (5,27).



Figuur 1 De samenstelling van lipoproteïnen (A) en een overzicht van de verschillende types lipoproteïnen gesorteerd volgens hun grootte en densiteit (B).

Aangepaste figuur afkomstig van Ridker P.M. LDL cholesterol: controversies and future therapeutic directions. Lancet 2014; 384: 607-17

LDL-partikels vervullen een belangrijke rol in de endogene cyclus van het lipidenmetabolisme. Zij vervoeren cholesterol naar de perifere weefsels, waar de aangevoerde lipiden gebruikt worden voor de productie van o.a. steroidhormoon, maar ook fungeren als een energiebron (5,27).

Stoornissen in het lipidenmetabolisme leiden tot een dyslipidemie. Dit laatste resulteert in een gewijzigde functie en/of concentratie van de plasma lipoproteïnen. Uit verschillende epidemiologische studies is gebleken dat verhoogde concentraties van LDL-cholesterol geassocieerd zijn met een verhoogd risico op coronair hartlijden (5, 6, 9). Verschillende klinische studies hebben bovendien aangetoond dat LDL-verlagende therapie het risico op coronair hartlijden reduceert (7, 8). Bijgevolg wordt door het National Cholesterol Education Program (NCEP) LDL-cholesterol als primair target voor lipiden verlagende therapie in hun Adult Treatment Panel III (ATPIII) aanbevolen (3,10). Ook in de Europese richtlijnen van de European Society of Cardiology (ESC) en de European Atherosclerosis Society (EAS) wordt LDL-cholesterol aanbevolen als een primair streefdoel voor de behandeling van dyslipidemieën (2).

Lipidentesten worden aangewend om het totaal cardiovasculaire risico van een persoon in te schatten. Zeker bij patiënten met diabetes mellitus type 2, gekende cardiovasculaire ziekten, hypertensie, rookverslaving, obesitas, chronische ontstekingsziekten, chronische nierziekten en een familiale voorgeschiedenis van hereditaire dyslipidemie strekt het tot de aanbeveling om lipidenbepalingen uit te voeren. Zelfs bij patiënten die een majeur coronair event hebben doorgemaakt, wordt aanbevolen om een lipidenprofiel binnen de 24 uur aan te vragen. Een lipidenbepaling kan ook worden overwogen bij mannen ouder dan 40 jaar en vrouwen ouder dan 50 jaar. Een standaard lipidenprofiel bestaat uit de bepaling van totaal cholesterol (TC), LDL-cholesterol (LDL-C), HDL-cholesterol (HDL-C) en Triglyceriden (TG). Bepaling van LDL-C wordt daarnaast ook aanbevolen als primaire lipidenanalyse voor de karakterisering van een dyslipidemie en als target bij de preventie van cardiovasculaire ziekten (2, 3,20, 26, 27).

TC en HDL-C kunnen eenvoudig door middel van directe enzymatische methoden in het routine klinisch laboratorium worden bepaald in zowel nuchtere als niet-nuchtere plasmastalen. De verschillen in TC en HDL-C tussen nuchtere en niet-nuchtere stalen zijn immers zeer klein en klinisch niet significant (27, 28).

TG zijn in nuchtere condities voornamelijk aanwezig in VLDL en hun remnant-partikels. Postprandiaal worden zij voornamelijk teruggevonden in chylomicronen en hun remnant-partikels. Een bepaling van TG in nuchtere versus niet-nuchtere omstandigheden, maakt bijgevolg wel degelijk een verschil (11, 20). Vroeger werden lipidentesten steeds nuchter bepaald, echter recent verscheen er een opiniestuk van EAS en de European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine in de European Heart Journal waarin wordt aangenomen dat een nuchtere status niet steeds vereist is (1). TG worden in het routine klinisch laboratorium bepaald door middel van een enzymatisch colorimetrische bepaling (27, 28).

Tot slot komen we tot de bepaling van LDL-C in plasma. De referentiemethode voor het bepalen van LDL-C is de bèta-kwantificatiemethode. Deze methode is gebaseerd op ultracentrifugatie en precipitatie. Het verbruik van een groot staalvolume, de tijd nodig voor het uitvoeren van de analyse, de benodigde expertise en de kost maken dat deze methode niet bruikbaar is in het routine klinisch laboratorium. Bijgevolg werden verschillende methoden ontwikkeld om LDL-C toch in het klinisch laboratorium routinematig te kunnen meten (3, 4, 10, 27, 28).

Friedewald W.T. publiceerde in 1972 een artikel in *Clinical Chemistry* waarin hij een formule voorstelt die op basis van TC, HDL-C en TG een inschatting maakt van de LDL-C. In deze formule wordt aangenomen dat er een constante TG:VLDL-C ratio bestaat in de VLDL-partikels van 5:1 en dit zowel in de gezonde populatie als alle hyperlipoproteïnemie-types met uitzondering van het zeldzame type Hyperlipoproteïnemie Type III. In een tweede assumptie neemt hij aan dat indien chylomicronen afwezig zijn, de meeste TG in VLDL-partikels aanwezig zijn. Bijgevolg kan men in nuchtere patiëntenstalen de VLDL-C inschatten door TG te delen door een vaste factor vijf. De LDL-C kan dan als volgt berekend worden: $LDL-C = TC - HDL-C - VLDL-C$, waarin de VLDL-C component wordt vervangen door "TG/5" (11). Deze formule is betrouwbaar bij TG-waarden kleiner dan 200 mg/dL, maar wordt in toenemende mate minder accuraat bij TG-waarden tussen 200 en 400 mg/dL. Bij TG-waarden boven de 400 mg/dL kan deze formule niet meer betrouwbaar gebruikt worden. Een tweede beperking aan het gebruik van deze formule is de accuraatheid. Deze formule accumuleert de meetfouten van drie laboratoriumtesten (TG, HDL-C en TG). Kortom de gekende Friedewald-Formule kampt met enkele beperkingen (4, 10, 11, 20, 27, 28). Als reactie hierop verschenen reeds lang geleden, maar ook nog recent artikels waarin verschillende modificaties van de formule werden voorgesteld en verdedigd om een accuratere inschatting van de LDL-C mogelijk te maken. Daarnaast werden ook directe methoden ontwikkeld om de vooropgestelde kwaliteitseisen inzake precisie en accuraatheid te bereiken (4).

In deze CAT zal eerst verder worden ingegaan op de voor- en nadelen van de verschillende methoden ter bepaling van de LDL-C die in de literatuur worden voorgesteld. Vervolgens wordt onderzocht welke implicaties voor de kliniek kunnen worden verwacht wanneer de directe methode wordt ingeruild voor een gevalideerde formule in het AZ Delta ziekenhuis.

QUESTION(S)

- 1) Welke methoden worden in de literatuur voorgesteld ter bepaling van de LDL-C?
- 2) Welke implicaties kunnen worden verwacht wanneer de directe methode wordt ingeruild voor een gevalideerde formule in het AZ Delta?

SEARCH TERMS

- 1) MeSH Database (PubMed): MeSH term: “Low density lipoprotein cholesterol” “Measurement of Low density Lipoprotein” “Friedewald Formula” “LDL Calculation” “Calculation compared with direct assay”
- 2) PubMed Clinical Queries (from 1966; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>): Systematic Reviews; Clinical Queries using Research Methodology Filters (“LDL-Cholesterol and Measurement” + “LDL-cholesterol and Cardiovascular Heart disease”)
- 3) PubMed (Medline; from 1966:) “Low density lipoprotein cholesterol” “Measurement of Low density Lipoprotein” “Friedewald Formula” “LDL Calculation” “Calculation compared with direct assay”
- 4) UpToDate (2017)

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

- 1) Guidelines and Recommendations (most recent topics on top)
 - (1) Fasting is not routinely required for determination of a lipid profile: clinical and laboratory implications including flagging at desirable concentration cut-points—a joint consensus statement from the European Atherosclerosis Society and European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *European Heart Journal*. 2016; 37: 1944–1958
 - (2) ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *European Heart Journal*. 2011; 32: 1769–1818
 - (3) National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert panel. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert panel on detection, evaluation and treatment of high cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002; 106:3: 143-421.
- 2) Reviews
 - (4) Nauck M, Warnick GR, Rifai N. Methods for measurement of LDL-cholesterol: a critical assessment of direct measurement by homogenous assays versus calculation. *Clin Chem*. 2002; 48: 236–54.
- 3) Original Articles
 - (5) Ridker PM. LDL-Cholesterol: controversies and future therapeutic directions. *Lancet* 2014; 384: 607-17.
 - (6) Ridker PM, Stampfer MJ, Rifai N. Novel risk factors for systemic atherosclerosis. *J Am Med Assoc*. 2001; 285: 2481-5.
 - (7) Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet*. 1994; 344:1383-9.
 - (8) The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group: prevention of cardiovascular events and death with Pravastatin in patients with coronary

- heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. *N Engl J Med.* 1998;339: 1349-57
- (9) Keevil JG, Cullen MW, Gangon R, McBride PE, Stein JH. Implications of cardiac risk and low density lipoprotein cholesterol distributions in the United States for the diagnosis and treatment of dyslipidemia: data from the National Health and Nutrition examination Survey 1999 to 2002. *Circulation.* 2007; 115: 1363-70.
 - (10) Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Programme (NCEP) Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III. *J Am Med Assoc.* 2001; 285: 2486-2497.
 - (11) Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972; 18: 499–502.
 - (12) DeLong DM, DeLong ER, Wood PD, Lippel K, Rifkind BM: A comparison of methods for the estimation of plasma low- and very low-density lipoprotein cholesterol: the Lipid Research Clinics Prevalence Study. *J Am Med Assoc.* 1986; 256: 2372-2377.
 - (13) McNamara JR, Cohn JS, Wilson PW, Schaefer EJ. Calculated values for low density lipoprotein cholesterol in the assessment of lipid abnormalities and coronary disease risk. *Clin Chem.* 1990; 36: 36–42.
 - (14) Anandaraja S, Narang R, Godeswar R, Lakshmy R, Talwar KK. Low density lipoprotein cholesterol estimation by a new formula in Indian population. *Int J Cardiol.* 2005;102: 117–20.
 - (15) Vujovic A, Stevulijevic JK, Spasic S, et al. Evaluation of different formulas for LDL-C calculation. *Lipids Health Dis.* 2010; 9: 27.
 - (16) Gupta S, Verma M, Singh K. Does LDL-C estimation using Anandaraja's Formula give a better agreement with direct LDL-C estimation than the Friedewald's Formula? *Ind J Clin Biochem.* 2012; 27: 127–33.
 - (17) Martin SS, Blaha MJ, Elshazly MB, Brinton EA, Toth PP, McEvoy JW, et al., Friedewald-estimated versus directly measured low density lipoprotein cholesterol and treatment implications. *J Am Coll Cardiol.* 2013; 62:8: 732-739.
 - (18) Martin SS, Blaha MJ, Elshazly MB, Toth PP, Kwiterovich PO, Blumenthal RS, Jones SR. Comparison of a novel method vs the Friedewald equation for estimating low-density lipoprotein cholesterol levels from the standard lipid profile. *JAMA.* 2013; 310: 2061– 8.
 - (19) Meeusen JW, Lueke AJ, Jaffe AS, Saenger AK. Validation of a proposed novel equation for estimating LDL cholesterol. *Clin Chem.* 2014; 60: 1519 –23.
 - (20) Bachorik PS, Ross JW. National Cholesterol Education Program recommendations for measurements of low-density lipoprotein cholesterol: executive summary. National Cholesterol Education Program Working Group on Lipoprotein Measurements. *Clin Chem.* 1995; 41: 1414–20.
 - (21) Miller WG, Myers GL, Sakurabayashi I, et al. Seven direct methods for measuring HDL and LDL cholesterol compared with ultracentrifugation reference measurement procedures. *Clin Chem.* 2010; 56: 977– 86.

- (22) Stein EA. Measuring LDL Cholesterol: for Old and New Calculations, Is There an Optimal Formula?. *Clin Chem.* 2014; 60:12: 1466-1468
- (23) Mora S, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. Comparison of LDL Cholesterol Concentrations by Friedewald Calculation and Direct Measurements in Relation to Cardiovascular Events in 27 331 Women. *Clin Chem.* 2009;55:5: 888– 894.
- (24) Agrawal M, Spencer HJ, Faas FH. The method of LDL cholesterol measurement influences Classification of LDL Cholesterol to Treatment Goals: Clinical Research Study. *J Investig Med.* 2010; 58:8: 945-949
- (25) Esteban-Salan M, Aguilar-Doreste JA, Arranz-Pena ML, Juve-Cuxart S. Multicentric evaluation of the homogeneous LDL-cholesterol Plus assay: Comparison with beta-quantification and Friedewald formula. *Clinical Biochemistry.* 2008; 41:16: 1402-1409
- (26) Van Deventer HE, Miller WG, Myers GL et al. Non-HDL Cholesterol Shows Improved Accuracy for Cardiovascular Risk Score Classification Compared to Direct of Calculated LDL Cholesterol in a Dyslipidemic Population. *Clin Chem.* 2001; 57:3: 490-501

4) Reference Works, Handbooks and Databases

- (27) Wegwijs in laboratoriumdiagnose. X. Bossuyt. ACCO Uitgeverij, Leuven, 2016, eerste druk, ISBN: 9789462923058
- (28) Measurement of blood lipids and lipoproteins – UpToDate, Rosenson RS. [Geraadpleegd op 01/04/2017].

5) Posters, “grey literature”, presentations

- (29) Langlois M. Niet-nuchtere lipiden testen, presentatie [Postgraduaat Klinische Biologie UZ Gent, 20/10/2016]
- (30) LDL Cholesterol Certification Protocol for Manufacturers, juni 2006

I. Welke methoden worden in de literatuur voorgesteld ter bepaling van de LDL-C?

I.1 Indirecte methoden voor de bepaling van LDL-C

Zoals in de inleiding reeds werd aangehaald stelde Friedewald W.T. in 1972 een formule voor waarbij de LDL-C eenvoudig kon worden ingeschat zonder gebruik te hoeven maken van de ultracentrifugatie-techniek. Deze formule werd afgeleid van het lipoproteïneprofiel van 448 Amerikanen. In deze studiepopulatie werden 96 gezonde individuen, 204 patiënten met hyperlipoproteïnemie Type II en 148 patiënten met hyperlipoproteïnemie Type IV geïnccludeerd. Deze hyperlipoproteïnemie types verwijzen naar de Frederickson Classificatie. Dit is een oude biochemisch fenotypische classificatie waarin de dyslipidemieën worden ingedeeld volgens het type lipoproteïne dat toegenomen is in plasma (Cfr. Bijlage I). Gezien de meeste data afkomstig waren van patiënten met een familiale hyperlipoproteïnemie en hun aanverwanten, was de onderzochte studiepopulatie geen representatieve steekproef van de algemene populatie. In deze studie werden goede correlaties geobserveerd ten opzichte van de ultracentrifugatie-techniek voor zowel de gezonde ($r = 0,98$), als de Hyperlipoproteïnemie Type II-patiënten ($r = 0,99$). Voor de Hyperlipoproteïnemie type IV-patiënten werd na exclusie van TG-levels >400 mg/dL een correlatiecoëfficiënt van 0,94 teruggevonden (11).

De Friedewald-formule kan enkel betrouwbaar worden toegepast op nuchtere plasmastalen en bij TG-levels kleiner dan 400 mg/dL. Voor patiënten met Hyperlipoproteïnemie type III is de Friedewald Formule (FF) niet bruikbaar. In deze populatie zijn immers aberrante VLDL-partikels aanwezig waardoor de term "TG/5" niet bruikbaar is voor de inschatting van de VLDL-C. Friedewald zelf erkende ook dat ondanks de goede overeenkomst tussen de berekende LDL-C en de gemeten LDL-C, de schatting van VLDL-C op basis van "TG/5" niet zeer accuraat is (4, 10, 11, 20). Bij vergelijking van de performantie van de Friedewald formule met de ultracentrifugatie-techniek valt op dat de bepaling van TC en HDL-C gemeenschappelijk componenten zijn van beide methoden. Bijgevolg zijn de verschillen in LDL-C voornamelijk gerelateerd aan de berekening van VLDL-C.

Ondanks zijn beperkingen, werd de Friedewald Formule al gauw geïntroduceerd in vele klinische laboratoria. Ook nu nog, anno 2017, 45 jaar na het verschijnen van het artikel, is dit nog steeds de meest gangbare praktijk in vele klinische laboratoria om de LDL-C in te schatten.

In de literatuur werden vervolgens meerdere modificaties van de Friedewald Formule voorgesteld om de accuraatheid van de LDL-C inschatting te verbeteren. In 1986 vergeleek Delong D.M. et al de Friedewald Formule met ultracentrifugatie in een studiepopulatie van meer dan 10 000 mannen,

vrouwen en kinderen. Volgens deze studiegroep kan de VLDL-C accurater worden ingeschat door TG te delen door zes in plaats van vijf (12). In 1990 publiceerde McNamara een studie waarin zowel de Friedewald Formule, als de methode voorgesteld door Delong D.M. et al, en een eigen voorgestelde formule werden vergeleken met ultracentrifugatie. In de eigen voorgestelde formule werden meerdere factoren (TG/4; TG/4,5; TG/5,5; TG/6; TG/7; TG/8) voor de inschatting van VLDL-C tegen elkaar afgewogen per TG-level. McNamara besloot dat de beste inschatting van VLDL-C werd bekomen door gebruik te maken van verschillende formules die worden uitgekozen per TG-level. Ondanks dat deze LDL-C-waarden meer concordant werden bevonden met de gemeten LDL-C-waarden, werd besloten dat de verschillen met F-LDL-C slechts minimaal waren. Beide formules slaagden er bijgevolg niet in om de Friedewald Formule aan kant te schuiven (13).

In 2005 werd er opnieuw een nieuwe formule voorgesteld, ditmaal afkomstig uit India. In een studiepopulatie van 2008 patiënten werd de LDL-C, berekend door middel van de Friedewald formule (F-LDL-C), vergeleken met direct gemeten LDL-C (D-LDL-C). De D-LDL-C werd bepaald gebruikmakend van een precipitatiemethode. Tussen de F-LDL-C en D-LDL-C met TG-levels kleiner dan 350 mg/dL werd een goede correlatie teruggevonden ($r= 0.92$). In een studiecohorte van 1000 patiënten werd de Anandaraja-formule opgesteld door middel van multiple regressie analyse. De, Anandaraja formule $[A\text{-LDL-C} = 0.9TC - (0.9TG/5) - 28]$, werd vervolgens gevalideerd in een validatiecohort van 1008 patiënten. Er werd geconcludeerd dat de F-LDL-C een (minimale) overschatting vertoont ten opzichte van de D-LDL-C. De A-LDL-C, die een uitstekende correlatie vertoonde met de D-LDL-C ($r=0.97$), lijkt meer accuraat te zijn voor de berekening van LDL-C in de Indische populatie. Deze methode biedt bovendien als voordeel dat enkel de bepalingen van TC en TG vereist zijn voor de berekening. Bijgevolg wordt ook de analytische fout van deze Anandaraja-formule kleiner (14).

Vujovic A. et al vergeleek de F-LDL-C en A-LDL-C met de D-LDL-C in 2053 patiënten. De D-LDL-C werd hierbij gemeten met de homogene enzymatische colorimetrische methode volgens Kyowa Medex (Roche Diagnostics). De D-LDL-C-waarden werden significant hoger bevonden dan de F-LDL-C- en de A-LDL-C-waarden. Ook in deze studie werd een nieuwe formule naar voren geschoven, met name: $LDL-C = TC - HDL-C - TG/6,85$. Een correlatie coëfficiënt van 0,96 werd teruggevonden tussen D-LDL-C en de nieuwe formule (15). In 2012 werd door Gupta et al de F-LDL-C en de A-LDL-C vergeleken met een directe enzymatische bepaling gebaseerd op de methode van Daiichi. Er werd een significante onderschatting weerhouden tussen de F-LDL-C en de A-LDL-C ten opzichte van de D-LDL-C. Daarnaast zou de Friedewald formule een betere overeenkomst vertonen met de D-LDL-C ten opzichte van de Anandaraja's formule (16).

Triglyceride Levels, mg/dL ^a	Non-HDL-C, mg/dL					
	<100	100-129	130-159	160-189	190-219	≥220
7-49	3.5	3.4	3.3	3.3	3.2	3.1
50-56	4.0	3.9	3.7	3.6	3.6	3.4
57-61	4.3	4.1	4.0	3.9	3.8	3.6
62-66	4.5	4.3	4.1	4.0	3.9	3.9
67-71	4.7	4.4	4.3	4.2	4.1	3.9
72-75	4.8	4.6	4.4	4.2	4.2	4.1
76-79	4.9	4.6	4.5	4.3	4.3	4.2
80-83	5.0	4.8	4.6	4.4	4.3	4.2
84-87	5.1	4.8	4.6	4.5	4.4	4.3
88-92	5.2	4.9	4.7	4.6	4.4	4.3
93-96	5.3	5.0	4.8	4.7	4.5	4.4
97-100	5.4	5.1	4.8	4.7	4.5	4.3
101-105	5.5	5.2	5.0	4.7	4.6	4.5
106-110	5.6	5.3	5.0	4.8	4.6	4.5
111-115	5.7	5.4	5.1	4.9	4.7	4.5
116-120	5.8	5.5	5.2	5.0	4.8	4.6
121-126	6.0	5.5	5.3	5.0	4.8	4.6
127-132	6.1	5.7	5.3	5.1	4.9	4.7
133-138	6.2	5.8	5.4	5.2	5.0	4.7
139-146	6.3	5.9	5.6	5.3	5.0	4.8
147-154	6.5	6.0	5.7	5.4	5.1	4.8
155-163	6.7	6.2	5.8	5.4	5.2	4.9
164-173	6.8	6.3	5.9	5.5	5.3	5.0
174-185	7.0	6.5	6.0	5.7	5.4	5.1
186-201	7.3	6.7	6.2	5.8	5.5	5.2
202-220	7.6	6.9	6.4	6.0	5.6	5.3
221-247	8.0	7.2	6.6	6.2	5.9	5.4
248-292	8.5	7.6	7.0	6.5	6.1	5.6
293-399	9.5	8.3	7.5	7.0	6.5	5.9
400-13975	11.9	10.0	8.8	8.1	7.5	6.7

Figuur 2 Mediane waarde voor TG:VLDL-C ratio per non-HDL-C en TG-niveau (180-cellentabel)

Figuur overgenomen van Martin SS et al. Comparison of a novel method vs the Friedewald equation for estimating low-density lipoprotein cholesterol levels from the standard lipid profile. *JAMA*. 2013; 310: 2061-8

vergelijking met de F-LDL-C ten opzichte van de D-LDL-C. Het grootste voordeel van deze nieuwe formule werd gevonden in de classificatie van LDL-C-levels lager dan 70 mg/dL en dit vooral in patiënten met gestegen TG-waarden (18).

De formule van Martin S.S. et al werd door Meeusen J.W. et al. geëvalueerd in een onafhankelijke studiepopulatie van 23 055 patiënten. In tegenstelling tot de studie van Martin S.S. et al die gebruik maakte van een Vertical Auto Profile voor de bepaling van D-LDL-C, werd in deze studie D-LDLC gemeten met de beta-kwantificatie referentiemethode. Er werd geconcludeerd dat de F-LDL-C de LDL-C onderschat, terwijl de nieuwe formule eerdere te kampen heeft met een overschatting van de LDL-C ten opzichte van de D-LDL-C. Beide methoden wijken bovendien significant af van de referentiemethode bij LDL-concentraties lager dan 70 mg/dL (19).

Zelfs na het verschijnen van deze nieuwe grotere studies blijft de Friedewald formule overeind. We kunnen concluderen dat het gebruik van de Friedewald formule een betrouwbare en kosten-

In 2013 werd door Martin S.S. et al een laatste modificatie aan de Friedewald formule voorgesteld. Ook deze formule concentreert zich op een accuratere inschatting van de VLDL-C. Op basis van de TG- en non-HDL-C-waarden afkomstig van het lipidenprofiel van een studiecohort van 900 605 patiënten werd een 180-cellen tabel opgesteld waarin de mediane TG:VLDL-C ratio per TG versus non-HDL-C-level wordt weergegeven (Cfr. Figuur 2). Op basis van het lipidenprofiel kan dan een geschikte factor voor de TG:VLDL-C ratio worden uitgekozen en in de Friedewald formule worden ingepast (17, 18). Deze tabel werd gevalideerd in een validatiecohort van 450 303 patiënten. Een meer accurate risicoclassificatie op basis van de de NCEP- en de ESC-guidelines werd met deze nieuwe formule bekomen in

effectieve methode is voor het meten van LDL-C in de klinische praktijk, indien de werkelijke LDL-C concentratie groter is dan 100 mg/dL en de TG-waarden kleiner zijn dan 400 mg/dL. Patiënten met secundaire hyperlipidemieën, zoals vaak het geval is in patiënten met diabetes mellitus, end-stage renaal falen, hepatische dysfunctie en hormoonsubstitutie therapie, hebben te kampen met hogere TG-waarden. De Friedewald formule is in deze patiëntenpopulatie als minder accuraat te beschouwen (3, 20, 28) .

1.2 Directe methoden voor de bepaling van LDL-C

Tot de directe methoden voor de bepaling van LDL-C behoren: ultracentrifugatie, elektroforese en de “directe methoden”. Beta-kwantificatie is de referentiemethode voor de bepaling van LDL-C die gebruik maakt van de ultracentrifugatie-techniek in combinatie met een precipitatie-techniek. Deze methode wordt enkel aangewend in gespecialiseerde laboratoria en in research-setting (3, 4, 20) . De elektroforese-techniek vormt de basis voor de Frederickson classificatie. In deze classificatie werden de diverse hyperlipoproteïnemieën geclassificeerd op basis van de scheidingspatronen van de lipoproteïnen. Bovengenoemde classificatie werd in de periode van zijn voorstelling als revolutionair beschouwd, maar is tegenwoordig historisch geworden. De elektroforese-techniek is vooral nuttig in het visualiseren van variërende lipoproteïnen. De techniek is arbeidsintensief in vergelijking met de geautomatiseerde enzymatische assay's en is daarom ook voorbehouden voor specialistische laboratoria (4).

De directe enzymatische assay's kunnen worden aangewend om accuraterer LDL-C waarden te meten bij TG-levels groter dan 400 mg/dL en in niet-nuchtere stalen. Deze methoden bieden als voordeel dat zij beschikken over een betere analytische performantie inzake accuraatheid en reproduceerbaarheid in vergelijking met de indirecte methoden. Bovendien hebben deze methoden ook aangetoond een goede overeenkomst te hebben met de bèta-kwantificatie techniek in patiënten met verhoogde TG-concentraties (3, 4, 10, 20).

In een eerste generatie directe methoden werd gebruik gemaakt van chemische precipitatie. Deze methoden waren echter niet in staat om zich als superieur te bewijzen en de Friedewald Formule te vervangen: Zowel vrije vetzuren als TG-waarden groter dan 400 mg/dL zorgden voor interferentie. De tweede generatie directe methoden waren gebaseerd op de immunoseparatie-techniek. De scheiding was “redelijk” specifiek voor LDL, maar ook sporen van VLDL werden gemeten bij hypertriglyceridemie. Hypercholesterolemie zorgde voor een negatieve bias. Intussen zijn deze reagentia niet meer op de markt beschikbaar (4).

Tot de derde generatie methoden behoren de “homogene assay's. In 1998 werd in opvolging van de introductie van homogene methoden voor HDL-C, de eerste homogene methode voor de bepaling van LDL-C op de markt gebracht. De mogelijkheid tot volledige automatisatie van deze assay's

verbeterde de precisie van de methode. Een nauwkeurige controle van de reactieduur en temperatuur leidden bovendien tot een verbeterde performantie. In deze methoden worden verschillende detergenten en chemicaliën als eerste toegevoegd om specifieke lipoproteïenklassen te blokkeren of op te lossen en zo specificiteit in de meting van LDL-C te bekomen. Vervolgens wordt het cholesterol afkomstig uit het LDL-partikel enzymatisch gemeten. Vijf verschillende commerciële methoden werden door Nauck M. gereviewd in 2002. De voor en nadelen van de ontwikkelde methoden worden weergegeven in Figuur 3 (4).

Procedure	Disadvantages	Advantages
Ultracentrifugation		
Sequential (20)	Tedious; large sample volume; relatively imprecise	Allows determination of lipoprotein composition
LRC method (combined with heparin/Mn ²⁺ ppt) ^a (16)	Tedious; large sample volume	Basis for CDC RM; well standardized; allows the determination of lipoprotein composition; relatively precise
Electrophoresis		
Qualitative paper (22), cellulose acetate (23), polyacrylamide (24)	Not quantitative	Easily interpretable lipoprotein profile; allows classification according to Fredrickson
Quantitative agarose gel electrophoresis (26)	Requires fresh specimen; Lp(a)-C not resolved	Atypical lipoproteins can be observed; reliable determination of LDL-C concentration
Agarose gel electrophoresis with subsequent enzymatic staining (32, 34, 36, 38)	Only semi-automated; requires experience; somewhat technique dependent	Traceable to CDC RM; relatively precise; allows detection of atypical lipoproteins and altered samples; gels can be stored for visual record
Friedewald calculation (40)	Well-known limitations: requires fasting; TGs <4000 mg/L; type III HLP excluded; relatively imprecise; accuracy declines with TGs >2000 mg/L; inaccurate with increased TGs, e.g., secondary HLPs	Extensive experience; used in many clinical studies; well-established clinical significance; convenient and inexpensive when TC, TGs, and HDL-C are measured
Homogeneous		
SOL LDL-C method (100)	General underestimation of LDL-C, especially at lower concentration range; LDL-C recovery, 97–105%; VLDL not totally excluded; only 52–64% of IDL-C measured; Lp(a)-C not measured?; ^b overestimation of LDL-C in type III HLP; reactive against buoyant and small, dense LDL-C?; apoE-rich HDL-C not totally excluded; affected by freezing?; classification of patients not demonstrated to be better than calculation	CRMLN certified; precise; broad linear range; fully automated; decreased TG interference (negative bias); modest interferences from bilirubin and hemoglobin; Lp(a)-C included?; does not measure Lp-X cholesterol; multicenter evaluations available; postprandial data promising, but not sufficient to recommend
SUR LDL-C method (111)	General underestimation of LDL-C; LDL-C recovery, 87%; VLDL not totally excluded; only 31–47% of IDL-C is measured; overestimation of LDL-C in type III HLP; 50% of Lp-X cholesterol also measured; reactive against buoyant and small, dense LDL-C?; apoE-rich HDL-C not totally excluded; freezing?; classification of patients no better than calculation; no multicenter evaluations	CRMLN certified; precise; broad linear range; fully automated; decreased TG interference (positive bias); interferences from bilirubin and hemoglobin significantly reduced; Lp(a)-C included; postprandial data promising, but not sufficient to recommend
PRO LDL-C method (102, 103)	LDL-C recovery?; VLDL not totally excluded; IDL-C?; Lp(a)-C?; overestimation of LDL-C in type III HLP; Lp-X cholesterol?; reactivity against buoyant and small, dense LDL-C?; apoE-rich HDL-C?; freezing?; classification of patients no better than calculation; no multicenter evaluations	CRMLN certified; precise; broad linear range; reasonably accurate; fully automated; decreased TG interference (positive bias); interferences from bilirubin and hemoglobin significantly reduced; postprandial data promising, but not sufficient to recommend
CAT LDL-C method (104)	LDL-C recovery?; VLDL not totally excluded; only 30% of IDL-C is measured; only 50% of Lp(a)-C is measured; Lp-X cholesterol?; reactivity against buoyant LDL-C decreased; apoE-rich HDL-C?; classification of patients?; LDL-C in type III HLP?; no multicenter evaluations	CRMLN certified; precise; broad linear range; fully automated; decreased TG interference; interferences from bilirubin and hemoglobin significantly reduced; freezing at –80°C acceptable; postprandial data promising, but not sufficient to recommend
CAL LDL-C method (115)	No independent evaluations	

^a ppt, precipitation.
^b ?, not known.

Figuur 3 Overzicht van verschillende methoden voor de bepaling van LDL-C

Aangepaste figuur overgenomen van Nauck.M et al Methods for Measurement of LDL-Cholesterol: A Critical Assessment of Direct Measurement by Homogeneous Assays versus Calculation. *Clinical Chem.*; 2002; 48:2: 236-254

Algemeen wordt besloten dat de analytische performantie van de directe methoden beter is ten opzichte van de indirecte methoden (4, 20). Een between-run imprecisie van kleiner dan 3% en een totale imprecisie van minder dan 4% wordt gehaald voor de homogene assays. De specificiteit van de homogene assays voor de LDL-C-fractie verschilt volgens het gebruikte reagens (3,4,10, 20).

In een studie van Miller W.G. uit 2010 werden zeven directe methoden voor de bepaling van HDL-C en LDL-C vergeleken met de ultracentrifugatie referentieprocedure voor wat betreft hun analytische performantie. Deze methoden (o.a. de Kyowa Medex-methode, verdeeld door Roche Diagnostics) maken gebruik van verschillende oppervlakte-actieve stoffen, ionische polymeren en andere componenten om zo specifiek mogelijk de bepaling van cholesterol in het gewenste lipoproteïne-partikel te kunnen bewerkstelligen. In deze studie (n=175) werden niet alleen gezonde patiënten (n=37) geïncludeerd, maar ook een groep van dyslipidemische patiënten (n=138), gezien de performantie van de directe assays in deze laatste groep niet onbelangrijk is. In alle methoden werden meer discordante resultaten teruggevonden voor de groep van dyslipidemische patiënten ten opzichte van de gezonde studiegroep. De LDL-C methode van Roche vertoonde consistent een negatieve bias. Daarnaast overschreden alle LDL-C methoden de vooropgestelde total error in de dyslipidemische studiegroep en dit werd voornamelijk toegeschreven aan staal-specifieke factoren. De samenstelling van aberrante lipoproteïnen aanwezig in diverse dyslipidemieën zijn vermoedelijk verantwoordelijk voor het veroorzaken van non-specificiteit in de directe methoden (21, 27).

Op basis van de literatuur kunnen we besluiten dat de directe methoden er nog niet in geslaagd zijn om de Friedewald formule aan de kant te schuiven. De directe methoden kennen voornamelijk hun toepassing in stalen waar de Friedewald formule omwille van zijn limitaties niet gebruikt kan worden. Bovendien zijn alle guidelines voor de behandeling van dyslipidemieën nog steeds gebaseerd op de F-LDL-C (2, 3, 4, 27, 28) .

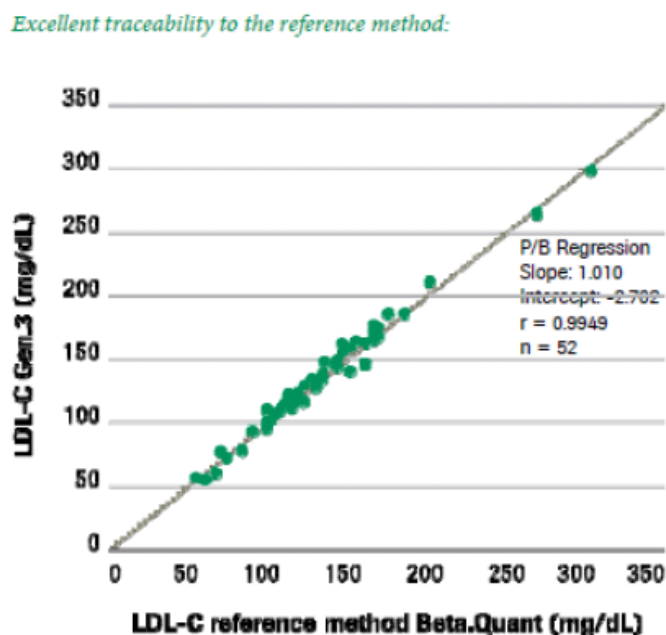
2. Welke implicaties kunnen worden verwacht wanneer de directe methode wordt ingevoerd voor een gevalideerde formule in het AZ Delta klinisch laboratorium?

In het AZ Delta laboratorium wordt tot op heden gebruik gemaakt van een directe homogene enzymatisch colorimetrische assay voor de bepaling van LDL-C. Gezien er in de literatuur geen evidentie wordt teruggevonden om een directe methode te verkiezen boven de Friedewald Formule, en dit mede omwille van economische factoren, werd er een retrospectieve studie opgezet waarin de gemeten LDL-C (D-LDL-C) wordt vergeleken met de F-LDL-C in AZ Delta. Ook een vergelijking met de Anandaraja formule werd tijdens deze studie uitgevoerd. Op basis van de Europese cut-off-waarden voor LDL-C, waarop verschillende interventiestrategieën zijn gebaseerd, werd een concordantie-analyse uitgevoerd tussen de indirecte methoden en de directe methode (beschouwd als vergelijkingsmethode in deze studie) (2). Tot slot werd een eigen Delta formule afgeleid uit een studiecohorte (n= 28772) door middel van multiple regressie analyse en gevalideerd in een validatiecohort (n= 3446).

2.1 Materialen en methoden

De studiecohort omvat alle stalen die werden ontvangen tijdens de periode van 01/01/2009 tot en met 28/06/2016. Stalen afkomstig van de intensive care unit (ICU), stalen ontvangen na 10 u 's ochtends en stalen waarvan het lipidenprofiel onvolledig was, werden uit de studie geëxcludeerd. Daarnaast werden ook stalen met een TG-level groter dan 400 mg/dL geëxcludeerd. In de studiecohort werden in totaal 28772 stalen geïncludeerd. De validatiecohort bestond uit 3446 stalen. Deze stalen werden ontvangen in de periode van 29/06/2016 tot en met 31/03/2017. Voor deze validatiecohort gelden dezelfde exclusie-criteria als voor de studiecohort.

De directe meting van LDL-C werd gedurende de volledige studieperiode uitgevoerd op de Cobas 6000 c501-module (Roche Diagnostics) in Ardolab. Voor de directe meting van LDL-C werd het LDL-C 2^e generatie-reagens gebruikt in de studiecohort en het LDL-C 3^e generatie-reagens in de validatiecohort. Beide reagentia zijn afkomstig van de firma Roche Diagnostics. Deze directe methoden werden gestandaardiseerd en gecertificeerd door directe vergelijking met een de Bèta-Kwantificatie methode in een Cholesterol Reference Method Laboratory Network-referentielaboratorium (20, 29). Het 3^e generatie LDL-C reagens zou een verbeterde robuustheid hebben ontwikkeld tegen endogene interferenties en minder kruisreactiviteit vertonen met chylomicronen en VLDL-fracties (Cfr. Bijlage 2). Volgens de kwaliteitsnota van Roche vertoont het LDL-C 3^e generatie reagens een uitstekende correlatie met de LDL-C referentiemethode (Cfr. Figuur 4). Deze methodevergelijking werd uitgevoerd op (slechts) 52 stalen.



Figuur 4 Passing&Bablok regressie-analyse tussen de LDL-C Beta-kwantificatiemethode (x) en het LDL-C 3e generatie reagens (y) (Roche diagnostics).

Figuur werd overgenomen uit de kwaliteitsnota CCA 2016-01 [Roche Diagnostics]

De directe bepaling van het volledige lipoproteïne-profiel wordt gelijktijdig uitgevoerd op de Cobas 6000-analyser. Zowel TC, HDL-C, LDL-C als TG worden geanalyseerd met reagentia en kalibratoren gedistribueerd door Roche Diagnostics. Gezien in deze studie retrospectief wordt teruggrepen naar stalen die afkomstig zijn uit de periode van 01/01/2009 tot 01/04/2017, verloopt deze studie over meerdere reagens- en kalibratorloten.

De totale CV% voor LDL-cholesterol bepaald met het 2^e generatie reagens over de periode van 01/01/2009 tot en met 28/06/2016 bedraagt 2,13%, 2,03% en 2,19% voor drie IQC-levels met een gemiddelde concentratie van 113, 58 en 97 mg/dL respectievelijk. De totale error voor deze drie IQC-materialen bedraagt respectievelijk 6,86%, 5,03% en 5,59%. Voor het LDL-C 3^e generatie reagens bedraagt de totale CV% 1,65%, 1,58% en 1,58% voor drie IQC-Levels met een gemiddelde concentratie van respectievelijk 99, 62 en 98 mg/dL. De totale error van deze drie IQC-materialen bedraagt 3,95%, 3,80% en 5,36% respectievelijk. Hiermee wordt voor beide studieperiodes volledig voldaan aan de kwaliteitseisen vooropgesteld door de NCEP (<4% voor CV% en <12% voor totale error) (3, 20).

Voor TC schommelt de totale CV% tijdens deze studieperiode tussen 1,52 en 2,27% over drie concentratieniveaus (189, 100 en 184 mg/dL). De totale error was maximum 7,14% en dit op een concentratieniveau van gemiddeld 100 mg/dL. Voor HDL-C wordt een gelijkaardige analytische performantie waargenomen met een maximale CV% van 2,93% en een totale error van 7,20% bij een gemiddelde concentratie van 63 mg/dL. TG tot slot heeft een maximale totale CV% van 1,82% op een concentratieniveau van 167 mg/dL. De historisch geobserveerde totale error bedraagt maximaal 7,02% bij een gemiddelde concentratie van 109 mg/dL.

Statistische analyses werden uitgevoerd gebruikmakend van MedCalc versie 16.1 (Medcalc, Software, Mariakerke, Belgium). De LDL-C concentraties verkregen met de directe methode werden vergeleken met de Friedewald Formule en de Anandaraja Formule. *P*-waarden werden verkregen met de Wilcoxon test om mediane waarden met elkaar te vergelijken. Tweezijdige *P*-waarden kleiner dan 0,05 werden als statistisch significant beschouwd. De Spearman correlatie coëfficiënt, Passing&Bablok regressie-analyse en concordantie-analyse werden gebruikt voor het vergelijken van de indirecte methoden met de directe methode. Deze laatste methode wordt in deze studie gebruikt als referentiemethode.

2.2 Resultaten

2.2.1 Studiepopulatie en distributies in LDL-C

In de studiecohort werden op basis van het lipoproteïneprofiel van 28772 patiënten de F-LDL-C en A-LDL-C berekend en vergeleken met de D-LDL-C. De mediane leeftijd van de subjecten uit de studiecohort bedraagt 64,4 jaar zoals wordt weergegeven in Tabel 1. Dit is gelijkaardig aan de mediane leeftijd die werd geobserveerd in de validatiecohort. Ook de mediane waarden voor TC, HDL-C, D-LDL-C en TG zijn gelijkaardig in beide populaties.

Tabel 1 Distributie lipidenprofiel in studie- en validatiecohort

Karakteristieken*	Studiecohort	Validatiecohort
N	28772	3446
Leeftijd, in jaren	64 (51 - 76)	63 (50 - 75)
TC, in mg/dL	179 (151 - 209)	173 (146 - 203)
HDL-C, in mg/dL	54 (43 - 67)	54 (43 - 68)
D-LDL-C, in mg/dL	102 (79 -128)	100 (77-128)
TG, in mg/dL	105 (78 - 148)	105 (77 - 147)

* De mediane waarde wordt weergegeven (IQR)

TC: Totaal Cholesterol; HDL-C: high-density-lipoprotein-Cholesterol; D-LDL-C: Direct gemeten low-density-lipoprotein-cholesterol; TG: Triglyceriden

In de studiecohort lag de mediane waarde voor F-LDL-C (Cfr. Tabel 3) 4 mg/dL lager dan de direct gemeten LDL-C waarde. De mediaan van A-LDL-C daarentegen lag 10 mg/dL hoger dan de D-LDL-C. Beide verschillen werden statistisch significant bevonden ($P < 0,05$). Individuen met een TG-concentratie lager dan 200 mg/dL vertoonden gelijkaardige verschillen. In de subjecten met een TG-concentratie tussen 200 en 400 mg/dL, een gebied waarin met weet dat de Friedewald formule minder accuraat LDL-C-waarden inschat, werden hogere waarden gemeten voor zowel F-LDL-C als D-LDL-C. In A-LDL-C daarentegen werd een lagere mediane waarde geobserveerd. Zoals reeds in de literatuur werd vermeld, wordt ook in deze studiecohort waargenomen dat de D-LDL-C hogere waarden meet voor LDL-C ten opzichte van F-LDL-C (23,24,25).

Tabel 2 Distributie van F-LDL-C, D-LDL-C en A-LDL-C in de studiecohort

Studiecohort	N	D-LDL-C (mg/dL)	F-LDL-C (mg/dL)	A-LDL-C (mg/dL)
		Mediaan (IQR)	Mediaan (IQR)	Mediaan (IQR)
Alle Subjecten	28772	102 (79-128)	98* (75-124)	112* (87-138)
Subjecten met TG <200 mg/dL	25661	100 (78-125)	97* (74-123)	112* (88-138)
Subjecten met TG 200 - 400 mg/dL	3111	121 (93-151)	107* (79-137)	109* (81-138)

* P -waarde $< 0,001$ met D-LDL-C als referentiemethode. P -waarden werden verkregen met de Wilcoxon-test en werden als statistisch significant beschouwd bij $p < 0,05$.

D-LDL-C: LDL-C gemeten met de directe methode; F-LDL-C: LDL-C berekend met de Friedewald formule; A-LDL-C: LDL-C berekend met de Anandaraja formule.

In de validatiecohort (Cfr. Tabel 3) worden gelijkaardige bevindingen waargenomen. De F-LDL-C heeft een significant lagere mediane waarde ten opzichte van de direct gemeten D-LDL-C. De A-LDL-C heeft een significant hogere waarde in de totale validatiecohort en in subjecten met een TG-concentratie lager dan 200 mg/dL. In individuen met een TG-concentratie tussen 200 en 400 mg/dL wordt een significant lagere mediane waarde geobserveerd ten opzichte van de D-LDL-C.

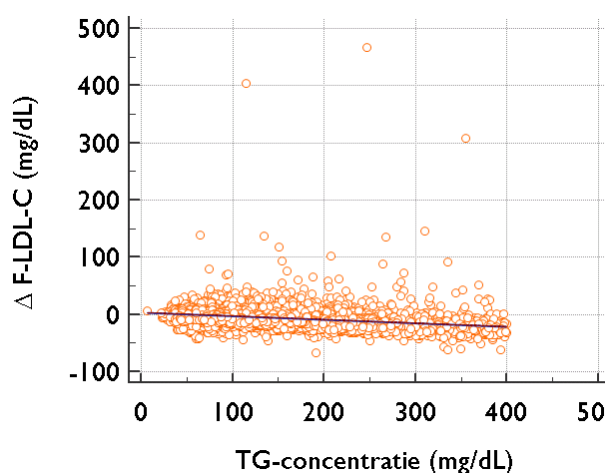
Tabel 3 F-LDL-C, D-LDL-C en A-LDL-C in de validatiecohort

Validatiecohort	N	D-LDL-C (mg/dL)	F-LDL-C (mg/dL)	A-LDL-C (mg/dL)
		Mediaan (IQR)	Mediaan (IQR)	Mediaan (IQR)
Alle Subjecten	3446	100 (77-128)	91* (70-118)	107* (82-133)
Subjecten met TG <200 mg/dL	3084	99 (77-126)	91* (70-117)	108* (84-133)
Subjecten met TG 200 - 400 mg/dL	310	108 (84-139)	93* (69-122)	99* (71-126)

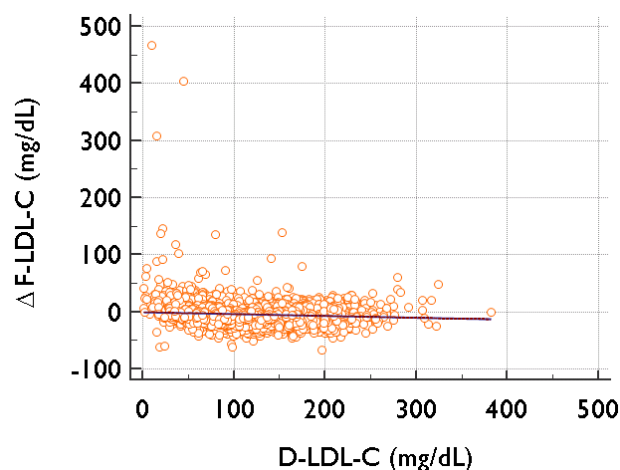
* P-waarde <0,001 met D-LDL-C als referentiemethode. P-waarden werden verkregen met de Wilcoxon-test en werden als statistisch significant beschouwd bij $p < 0.05$.

D-LDL-C: LDL-C gemeten met de directe methode; F-LDL-C: LDL-C berekend met de Friedewald formule; A-LDL-C: LDL-C berekend met de Anandaraja formule.

In Figuur 5 wordt het absoluut verschil in LDL-C-waarde tussen F-LDL-C en D-LDL-C grafisch weergegeven. Naarmate de TG-concentratie toeneemt wordt het verschil tussen de berekende F-LDL-C en gemeten D-LDL-C waarde groter in negatieve richting. In Figuur 6 wordt het absoluut verschil tussen F-LDL-C en D-LDL-C weergegeven ten opzichte van de D-LDL-C. Visueel bemerken we de grootste afwijkingen in het gebied met een D-LDL-C-waarde kleiner dan 100 mg/dL.



Figuur 5 Scattergram Absoluut verschil F-LDL-C t.o.v D-LDL-C (Δ F-LDL-C) versus TG-concentratie in de studiecorte



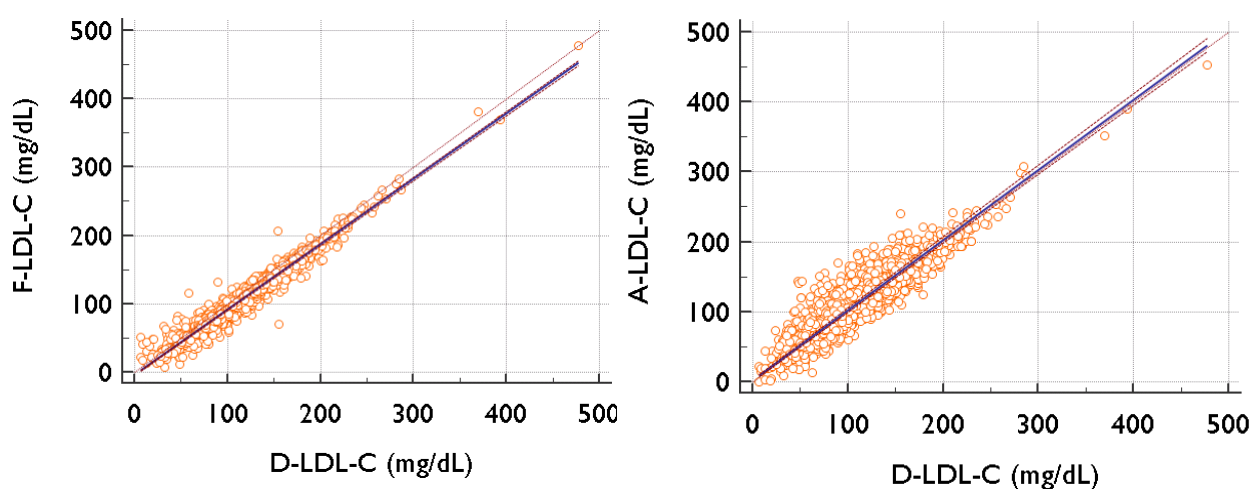
Figuur 6 Scattergram Absoluut verschil F-LDL-C t.o.v D-LDL-C (Δ F-LDL-C) versus D-LDL-C concentratie in de studiecorte

2.2.2 Correlaties tussen de indirecte methoden en de directe methode

Met de Spearman coëfficiënt ($r=0,965$, 95%CI[0,964 - 0,965]) kan een goede correlatie tussen D-LDL-C en F-LDL-C in de studiecohorte worden aangetoond. Tussen D-LDL-C en A-LDL-C bedraagt deze coëfficiënt slechts 0,857 (95%CI[0,854 - 0,860]). In de validatiecohorten worden gelijkaardige Spearman coëfficiënten geobserveerd: r was gelijk aan 0,975 (95%CI[0,973 - 0,976]) tussen D-LDL-C en F-LDL-C, maar slechts 0,885 (95%CI[0,878 - 0,892]) tussen D-LDL-C en A-LDL-C. Bijgevolg lijkt de A-LDL-C meer af te wijken voor de bepaling van LDL-C ten opzichte van de F-LDL-C in de AZ-Delta populatie.

2.2.3 Methodeverlijking tussen de indirecte methoden en de directe methode

In Figuur 7A wordt de Passing&Bablok-regressie analyse weergegeven tussen D-LDL-C versus F-LDL-C in de validatiecohorten. De vergelijking $Y = 0,9571 \cdot X - 3,5129$ beschrijft het verband tussen beide methoden. Gezien het 95%CI-interval van de richtingscoëfficiënt [0,9508 - 0,9636] 1,00 niet bevat en het 95%CI-interval van het intercept [-4,1473 - -2,8985] 0 niet bevat, vertoont F-LDL-C zowel een proportionele als een systematische bias ten opzichte van D-LDL-C. Hiermee wordt nogmaals bevestigd dat de Friedewald formule de LDL-C-concentraties steeds lager inschat in vergelijking met de D-LDL-C. In Figuur 7B wordt de Passing&Bablok regressie-analyse weergegeven tussen D-LDL-C en A-LDL-C in de validatiecohorten. Met de vergelijking $Y = 1,0031 \cdot X - 2,9878$, waarbij het 95%CI van de rico gelijk is aan [0,9876 - 1,0188] en 95%CI van het intercept gelijk is aan [1,4660 - 4,5959], wordt besloten dat A-LDL-C systematisch hogere waarden voor LDL-C berekend in vergelijking met D-LDL-C.



Figuur 7 Passing&Bablok regressie-analyse tussen F-LDL-C vs D-LDL-C (A) en A-LDL-C vs D-LDL-C (B) in de validatiecohorten

2.2.4 Opstelling van onze eigen Delta-Formule

Door middel van multiple regressie analyse werd uit de studiecohorte een nieuwe formule voor de berekening van LDL-C afgeleid op basis van TC, HDL-C en TG, waarmee mogelijk de beste inschatting van de LDL-C kan worden gemaakt in onze eigen AZ Delta-populatie. De Delta formule ziet er als volgt uit: $Y = (0,9264 * TC) - (0,7621 * HDL-C) - (0,09685 * TG) - 8,6308$. De P-waarde voor elke regressie coëfficiënt werd als statistisch significant beschouwd, waardoor zowel TC, HDL-C als TG noodzakelijk zijn voor het inschatten van de LDL-C concentratie (Cfr. Tabel 4). Deze formule werd vervolgens gevalideerd in een validatiecohort. De correlatiecoëfficiënt tussen D-LDL-C en Delta-LDL-C bedraagt 0,982 (95%CI[0,981 - 0,983]). Op basis van de Passing&Bablok regressie-analyse besluiten we dat deze Delta formule zowel een systematische als een proportionele bias vertoont ten opzichte van de D-LDL-C. Voorbij het punt waar Y gelijk is aan X (47mg/dL) worden door de Delta-LDL-C vergelijking lagere concentraties ten opzichte van de D-LDL-C berekend. Een tweede vereenvoudigde formule werd voorgesteld op basis van voorgaande regressie-analyse: $Y = TC - 0.8 HDL-C - 0.1 TG - 10$.

Tabel 4 Multiple Regressie analyse: overzicht van constante* en regressie coëfficiënten

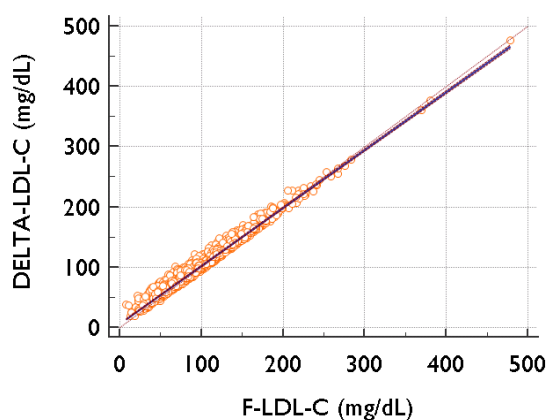
Variabele	Regressie Coëfficiënt	SE	P-waarde†
TC	0,9264	0,001	<0,001
HDL-C	-0,7621	0,003	<0,001
TG	-0,09685	0,001	<0,001

*Constante, -8,6308

† P-waarde <0,05 werd als statistisch significant beschouwd

TC: Totaal Cholesterol; HDL-C: High-Density-Lipoprotein- Cholesterol; TG: triglyceriden; SE: Standaard error

Naast een vergelijking met de D-LDL-C, werd ook een Passing&Bablok regressie-analyse uitgevoerd in de validatiecohort tussen de Delta-LDL-C en de F-LDL-C als referentiemethode. Er werd zowel een proportionele als systematische bias vastgesteld tussen beide methode ($Y = 7,145691 + 0,960425$



Figuur 8 Passing&Bablok regressie-analyse tussen Delta-LDL-C vs F-LDL-C

X met 95%CI slope [0.9561 – 0.9647] en 95%CI intercept [6,7260 – 7,5625]) (Cfr. Figuur 8). Tot een LDL-C waarde van 179 mg/dL worden er door de Delta Formule hogere waarden gemeten t.o.v. F-LDL-C. Een inschatting van de LDL-C op basis van de Delta Formule leunt daarmee dichterbij de D-LDL-C ten opzichte van de F-LDL-C. Ook voor de vereenvoudigde formule werd een Passing&Bablok regressie-analyse uitgevoerd: $Y = 8,476407 + 1,040530 X$ met 95%CI intercept [8,0023 – 8,9575] en 95%CI slope [1,03555 –

1,0455]. Volgens dit verband worden zowel systematisch als proportioneel hogere waarden gemeten door de vereenvoudigde Delta-LDL-C ten opzichte van de F-LDL-C.

2.2.5 Concordantie-analyse

Zowel in de studiecohorte als validatiecohorten werd een concordantie-analyse uitgevoerd tussen de indirecte methoden en de directe meting van LDL-C (Cfr. Bijlage 3). In bijgevoegde tabellen (Tabel 5 en 6) worden de resultaten van deze analyse weergegeven. Zowel in de studiecohorte als de validatiecohorten neemt de concordantie tussen F-LDL-C en D-LDL-C toe met afnemende D-LDL-C waarde. Een fenomeen dat ook werd waargenomen in de studie van Agrawal M et al. Bij LDL-C <70 mg/dL wordt de beste concordantie bereikt. Echter uit de literatuur weet men dat juist in deze categorie de Friedewald-formule een grote onderschatting vertoont ten opzichte van de BQ-methode en mogelijk tot onderbehandeling van de patiënt leidt. Zoals in Figuur 6 reeds werd weergegeven wijken de F-LDL-C en D-LDL-C absoluut ook het meeste af in dit gebied. Desalniettemin worden de LDL-C resultaten van beide methoden met een concordantie van 91% tot de klasse <70 mg/dL gecategoriseerd.

Tabel 5 Concordantie-analyse van F-LDL-C en A-LDL-C ten opzichte van D-LDL-C in de studiecohorte

D-LDL-C (mg/dL)	N	F-LDL-C		A-LDL-C	
		Concordant	% (95%CI)	Concordant	% (95%CI)
≥190	604	437	72 (68 - 76)	438	73 (69 - 77)
155 - 189	2201	1406	64 (62 - 66)	1317	60 (58 - 62)
100 - 154	12289	10140	83 (82 - 84)	9581	78 (77 - 78)
70 - 99	8995	6874	76 (75 - 77)	4603	51 (50 - 52)
<70	4683	4265	91 (90 - 92)	2672	57 (56 - 58)

Algemeen vertoont de F-LDL-C een betere concordantie met de directe methode dan de A-LDL-C. Dit weerspiegelt zich ook in de gewogen Kappa-scores. Voor F-LDL-C bedraagt deze 0,885 95%CI[0,882-0,888] in vergelijking met een waarde van 0,763 95%CI[0,758-0,769] voor A-LDL-C. Bij de discordanties wordt opgemerkt dat het gebruik van de directe methode vooral leidt tot het hoger categoriseren van de LDL-C waarde met 1 LDL-C-categorie hoger dan de F-LDL-C (24).

Tabel 6 Concordantie-analyse van F-LDL-C en A-LDL-C ten opzichte van D-LDL-C in de validatiecohorten

D-LDL-C (mg/dL)	N	F-LDL-C		A-LDL-C	
		Concordant	% (95%CI)	Concordant	% (95%CI)
≥190	83	48	58 (45 - 69)	64	77 (66 - 86)
155 - 189	276	153	55 (49 - 61)	165	60 (54 - 66)
100 - 154	1380	1042	76 (74 - 78)	1123	81 (79 - 83)
70 - 99	1105	816	74 (71 - 77)	607	55 (52 - 58)
<70	602	583	97 (95 - 98)	401	67 (63 - 71)

De algemene concordantie tussen F-LDL-C en D-LDL-C in de categorie van patiënten met een TG-concentratie tussen 200 en 400 mg/dL bedraagt slechts 63%. Algemeen worden 56% van de majeure discordanties gezien bij patiënten met een TG-concentratie hoger dan 200 mg/dL.

Ook de Delta-formule werd in de validatiecohortte vergeleken ten opzichte van de directe methode (Tabel 7). De algemene concordantie tussen Delta-LDL-C en de directe methode bedraagt 84,5%, in vergelijking met 76,7% voor de Friedewald formule. Ook de vereenvoudigde Delta Formule vertoont een goede concordantie in de validatiecohortte. Bovendien blijft de concordantie groter dan 80% over vier van de vijf LDL-C risicocategoriën.

Tabel 7 Concordantie-analyse van Delta-LDL-C en Delta_easy-LDL-C ten opzichte van D-LDL-C in de validatiecohortte

D-LDL-C (mg/dL)	N	Delta-LDL-C		Vereenvoudigde Delta-LDL-C	
		Concordant	% (95%CI)	Concordant	% (95%CI)
≥190	83	53	64 (53 - 74)	80	96 (89 - 99)
155 - 189	276	170	62 (56 - 68)	246	89 (85 - 92)
100 - 154	1380	1183	86 (84 - 88)	1284	93 (92 - 94)
70 - 99	1105	955	86 (84 - 86)	896	81 (79 - 83)
<70	602	552	92 (90 - 84)	447	74 (70 - 77)

De gewogen Kappa-score voor Delta-LDL-C met de directe methode bedraagt 0,91 95%CI[0.902-0.918] wat wijst op een goede overeenkomst tussen beide methoden. Met de vereenvoudigde Delta formule wordt een gewogen Kappa-score van 0,918 95%CI[0,911-0,926] bereikt. Ook deze formule lijkt dus bruikbaar voor het indirect voorspellen van de LDL-C waarde in de AZ Delta-populatie.

2.3 Conclusie

In deze studie werd een uitvoerige vergelijking doorgevoerd tussen verschillende beschikbare indirecte methoden voor de bepaling van LDL-C en de directe methode. Als directe methode werd de homogene enzymatisch colorimetrische assay van Roche Diagnostics gebruikt. Een goede correlatie tussen F-LDL-C en D-LDL-C werd waargenomen. Al zijn er de toch wel grote verschillen in categorisatie volgens de ESC-guidelines vastgesteld. Zoals in de literatuur reeds meermaals werd gesuggereerd, bevestigt deze studie dat met de directe methode hogere LDL-C-waarden worden gemeten. Dit laatste leidt tot het hoger categoriseren van patiënten volgens de ESC-guidelines. Wat mogelijk tot overbehandeling van patiënten kan leiden, aangezien de meeste guidelines en clinical trials gebaseerd zijn op de F-LDL-C waarden. Ook onze eigen voorgestelde formule die werd afgeleid uit een studiecohortte, vertoont een goede correlatie in de validatie-cohortte. Bovendien werd een concordantie van >80% over vier van de vijf risico-categoriën voor de vereenvoudigde Delta Formule vastgesteld.

Er zijn een aantal limitaties aan deze studie verbonden. Het ontbreken van een vergelijking met de referentiemethode is de voornaamste. Dit maakt dat we niet kunnen concluderen met welke methode het meest accuraat de LDL-C concentraties worden bepaald. We kunnen wel concluderen dat met de directe methode significant hogere concentraties worden gemeten dan met de Friedewald formule. Dit laatste leidt mogelijk tot overbehandeling van de patiënt in AZ Delta.

Bovendien werd er geen link gelegd met de kliniek van de patiënten. Omwille van het ontbreken van klinische gegevens kon niet worden nagegaan hoe de directe en indirecte methoden zich ten opzichte van elkaar verhouden in een normale gezonde versus een dyslipidemische populatie. Dit laatste zou een interessant gegeven zijn, daar de directe methoden gestandaardiseerd zijn volgens de CDC-protocollen. Deze hebben als belangrijk nadeel dat ze voornamelijk gevalideerd worden op sera van gezonde patiënten. Bijgevolg bestaat er een belangrijke bezorgdheid over de accuraatheid van de directe methoden in dyslipidemische stalen (21, 24, 25, 27). Een verdere uitwerking van de verzamelde data in AZ Delta met een link naar de kliniek is dus gewenst. Tot slot was ook de voedingstatus van de patiënt (nuchter versus niet-nuchter) in onze studie niet gekend. Echter het aantal niet-nuchtere stalen werd beperkt door stalen later ontvangen dan 10u te excluderen.

Gezien op basis van de huidige literatuurgegevens geen voorkeur kan worden gegeven aan een directe methode bij TG-levels kleiner dan 400 mg/dL, lijkt economisch gezien de Friedewald Formule een betere keuze voor het bepalen van de LDL-C. In de European Heart Journal verscheen recent een opiniestuk waarin het niet-nuchter screenen van lipidenprofielen wordt aanbevolen (1). In niet-nuchtere stalen lijkt de directe methode op het eerste zicht een betere keuze. Al blijkt uit de literatuur dat LDL-C-waarden die direct gemeten worden gelijkaardig zijn aan deze die berekend worden voor zowel nuchtere als niet-nuchtere stalen met een TG-waarde <400 mg/dL (1, 17). Aanwezigheid van chylomicronen kan natuurlijk wel leiden tot een onderschatting van de LDL-C indien de Friedewald Formule wordt gebruikt (11). Volgens het opiniestuk kan een “aangepaste formule” dit omzeilen, waarmee voornamelijk wordt verwezen naar het artikel van Martin S.S et al (18). Gezien vele richtlijnen zijn gericht op de F-LDL-C waarde, lijkt het in gebruik nemen van een alternatieve formule ons ook geen optimale keuze. Additioneel kan aan het laborapport ook de non-HDL-C waarde [TC – HDL-C] worden toegevoegd. Deze waarde is equivalent aan LDL-C, remnant cholesterol en Lipoproteïne(a) cholesterol en is niet afhankelijk van variaties in TG. Het gebruik van de non-HDL-C waarde voor cardiovasculaire risico voorspelling wordt bovendien ook sterk benadrukt in verschillende guidelines (1,2). Bij hypertriglyceridemie moeten non-HDL-C waarden voorzichtig worden geïnterpreteerd, gezien fouten in HDL-C metingen kunnen leiden tot fouten in de non-HDL-C berekening (27). Toch zouden de non-HDL-C berekeningen in dyslipidemische patiënten tot een juistere risicoclassificatie leiden dan LDL-C-waarden (26).

Op basis van bovenstaande bevindingen wordt in AZ Delta geadviseerd voor het rapporteren van de LDL-C waarden op basis van de Friedewald Formule bij stalen met TG-waarden kleiner dan 400 mg/dL. Daarnaast zal ook de non-HDL-C waarde aan elk rapport worden toegevoegd, zodat bij elke patiënt een voorspelling van het cardiovasculaire risico kan worden uitgevoerd.

TO DO/ACTIONS

1) Verzamelde data verder analyseren in relatie tot de kliniek van de patiënten

BIJLAGEN

Bijlage I

Frederickson Classification of Lipid Disorders

Type	Average of overnight serum	Elevated particles	Associated clinical disorders	Serum TC	Serum TG
I	Creamy top layer	Chylomicrons	Lipoprotein lipase deficiency, apolipoprotein C-II deficiency	N	++
IIa	Clear	LDL	Familial hypercholesterolemia, polygenic hypercholesterolemia, nephrosis, hypothyroidism, familial combined hyperlipidemia	++	N
IIb	Clear	LDL, VLDL	Familial combined hyperlipidemia	++	+
III	Turbid	IDL	Dysbetalipoproteinemia	+	+
IV	Turbid	VLDL	Familial hypertriglyceridemia, familial combined hyperlipidemia, sporadic hypertriglyceridemia, diabetes	N+	++
V	Creamy top, turbid bottom	Chylomicrons, VLDL	Diabetes	+	++

Note that the WHO classification is simply a biochemical phenotypic classification based on which lipoprotein is raised. Also the classification was devised before the importance of HDL as a prognostic indicator was recognised.

* IDL = intermediate-density lipoproteins; LDL = low-density lipoproteins; TC = total cholesterol; TG = triglycerides; VLDL = very low-density lipoproteins;

+ = increased; ++ = greatly increased; N = normal; N+ = normal or increased

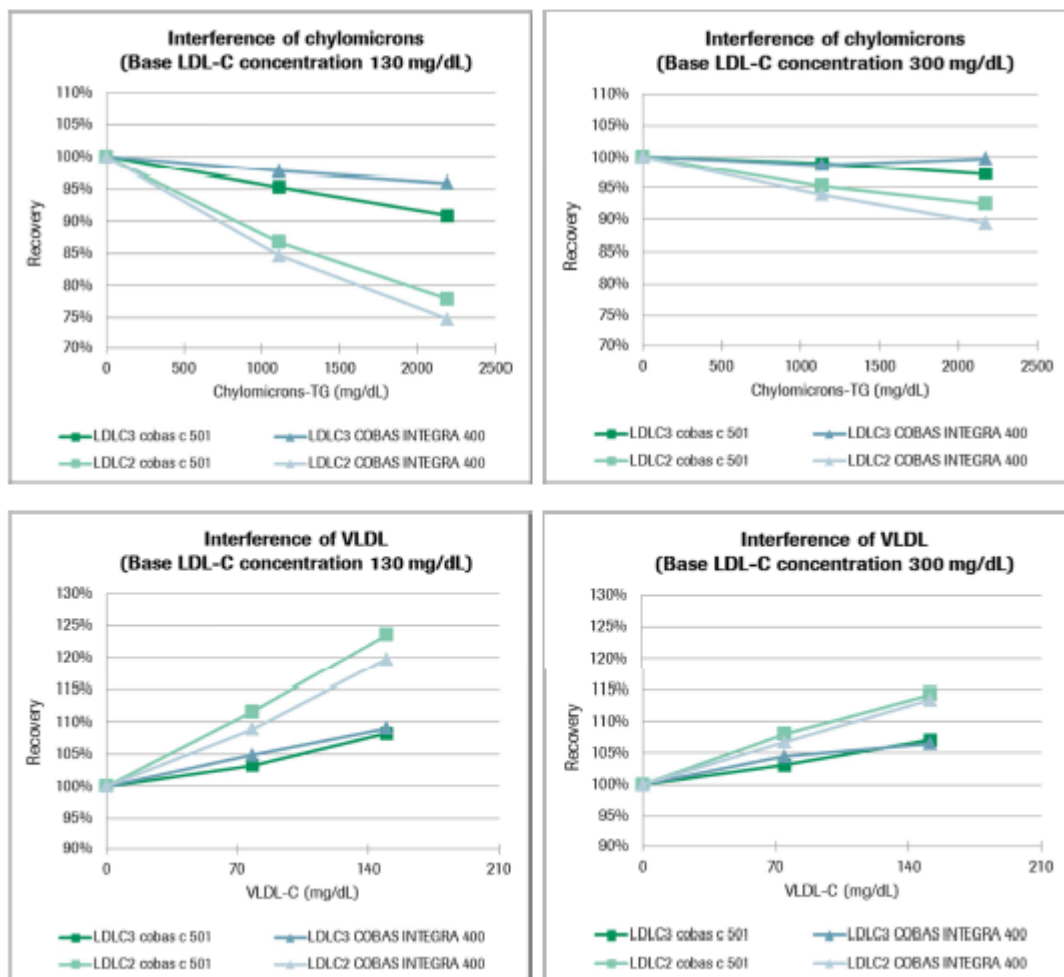
Bijlage 2

B. LDL-Cholesterol Gen.3: overzicht van de wijzigingen en voordelen

- ✓ Verbeterde robuustheid tegen endogene interferenties:
- ✓ Sterk verminderde interferentie van ascorbinezuur

	LDL-C2	LDL-C3
Geen interferentie tot een conc. (mg/dL) van:		
I-index	60	60
L-index	200	1000
H-index	1000	1000
Ascorbinezuur	50	500

- ✓ Minder kruisreactiviteit met chylomicrons en VLDL-fracties



Bijlage 3

Concordantie-analyse in de studiecohorte met TG < 400 mg/dL:

CONCORDANTIE-ANALYSE Friedewald versus Gemeten:						CONCORDANTIE-ANALYSE Anandaraja versus Gemeten:							
		D-LDL-C							D-LDL-C				
		<70 mg/dL	70 tot <100 mg/dL	100 tot <155 mg/dL	155 tot <190 mg/dL	>190 mg/dL			<70 mg/dL	70 tot <100 mg/dL	100 tot <155 mg/dL	155 tot <190 mg/dL	>190 mg/dL
F-LDL-C	<70 mg/dL	4265	1636	6	0	0	A-LDL-C	<70 mg/dL	2672	777	10	0	0
	70 tot <100 mg/dL	404	6874	1904	0	0		70 tot <100 mg/dL	1643	4683	1046	0	0
	100 tot <155 mg/dL	9	483	10140	723	1		100 tot <155 mg/dL	355	3461	9581	591	5
	155 tot <190 mg/dL	2	1	237	1406	166		155 tot <190 mg/dL	10	69	1551	1317	166
	>190 mg/dL	3	1	2	72	437		>190 mg/dL	3	5	101	293	438
28772		CONCORDANT%: 80,36				28777		CONCORDANT%: 64,95					
		DISCORDANT%: 19,55						DISCORDANT%: 33,11					
		Majeure DISCORDANTIE% 0,09						Majeure DISCORDANTIE% 1,94					

Concordantie-analyse in de studiecohorte met TG 200 - 400 mg/dL:

CONCORDANTIE-ANALYSE Friedewald versus Gemeten:						CONCORDANTIE-ANALYSE Anandaraja versus Gemeten:							
		D-LDL-C							D-LDL-C				
		<70 mg/dL	70 tot <100 mg/dL	100 tot <155 mg/dL	155 tot <190 mg/dL	>190 mg/dL			<70 mg/dL	70 tot <100 mg/dL	100 tot <155 mg/dL	155 tot <190 mg/dL	>190 mg/dL
F-LDL-C	<70 mg/dL	249	302	5	0	0	A-LDL-C	<70 mg/dL	254	280	10	0	0
	70 tot <100 mg/dL	15	343	452	0	0		70 tot <100 mg/dL	13	334	431	0	0
	100 tot <155 mg/dL	4	13	1018	247	0		100 tot <155 mg/dL	2	44	1004	273	5
	155 tot <190 mg/dL	1	1	8	229	96		155 tot <190 mg/dL	0	2	37	195	100
	>190 mg/dL	2	1	0	4	121		>190 mg/dL	2	0	1	12	112
TOTAAL 3111		CONCORDANT%: 63,00				TOTAAL 3111		CONCORDANT%: 61,04					
		DISCORDANT%: 36,55						DISCORDANT%: 38,25					
		Majeure DISCORDANTIE% 0,45						Majeure DISCORDANTIE% 0,71					
		SOM % 100,00						SOM % 100,00					

Concordantie-analyse in de studiecohorte met TG < 200 mg/dL:

CONCORDANTIE-ANALYSE Friedewald versus Gemeten:						CONCORDANTIE-ANALYSE Anandaraaja versus Gemeten:							
		D-LDL-C							D-LDL-C				
		<70 mg/dL	70 tot <100 mg/dL	100 tot <155 mg/dL	155 tot <190 mg/dL	>190 mg/dL			<70 mg/dL	70 tot <100 mg/dL	100 tot <155 mg/dL	155 tot <190 mg/dL	>190 mg/dL
F-LDL-C	<70 mg/dL	4016	1334	1	0	0	A-LDL-C	<70 mg/dL	2418	497	0	0	0
	70 tot <100 mg/dL	389	6531	1452	0	0		70 tot <100 mg/dL	1630	4349	615	0	0
	100 tot <155 mg/dL	5	470	9122	476	1		100 tot <155 mg/dL	353	3417	8577	318	0
	155 tot <190 mg/dL	1	0	229	1177	70		155 tot <190 mg/dL	10	67	1514	1122	61
	>190 mg/dL	1	0	2	68	316		>190 mg/dL	1	5	100	281	326
TOTAAL	25661					TOTAAL	25661						
CONCORDANT%: 82,47						CONCORDANT%: 65,44							
DISCORDANT%: 17,49						DISCORDANT%: 32,47							
Majeure DISCORDANTIE% 0,04						Majeure DISCORDANTIE% 2,09							
SOM % 100,00						SOM % 100,00							

Concordantie-analyse in de validatiecohort met TG < 400 mg/dL:

CONCORDANTIE-ANALYSE Friedewald versus Gemeten:						CONCORDANTIE-ANALYSE Anandaraaja versus Gemeten:							
		D-LDL-C							D-LDL-C				
		<70 mg/dL	70 tot <100 mg/dL	100 tot <155 mg/dL	155 tot <190 mg/dL	>190 mg/dL			<70 mg/dL	70 tot <100 mg/dL	100 tot <155 mg/dL	155 tot <190 mg/dL	>190 mg/dL
F-LDL-C	<70 mg/dL	583	280	3	0	0	A-LDL-C Berekend Anandaraaja	<70 mg/dL	401	125	2	0	0
	70 tot <100 mg/dL	18	816	332	1	0		70 tot <100 mg/dL	174	607	129	0	0
	100 tot <155 mg/dL	1	9	1042	121	0		100 tot <155 mg/dL	27	371	1123	79	0
	155 tot <190 mg/dL	0	0	2	153	35		155 tot <190 mg/dL	0	2	121	165	19
	>190 mg/dL	0	0	1	1	48		>190 mg/dL	0	0	5	32	64
TOTAAL	3446					TOTAAL	3446						
CONCORDANT%: 76,67						CONCORDANT%: 68,49							
DISCORDANT%: 23,16						DISCORDANT%: 30,47							
Majeure DISCORDANTIE% 0,17						Majeure DISCORDANTIE% 1,04							
SOM % 100,00						SOM % 100,00							

CONCORDANTIE-ANALYSE Delta-LDL-C versus Gemeten:						CONCORDANTIE-ANALYSE vereenvoudigde Delta-LDL-C versus Gemeten:							
		D-LDL-C							D-LDL-C				
		<70 mg/dL	70 tot <100 mg/dL	100 tot <155 mg/dL	155 tot <190 mg/dL	>190 mg/dL			<70 mg/dL	70 tot <100 mg/dL	100 tot <155 mg/dL	155 tot <190 mg/dL	>190 mg/dL
Delta-LDL-C	<70 mg/dL	552	123	0	0	0	Vereenvoudigde Delta-LDL-C	<70 mg/dL	447	23	0	0	0
	70 tot <100 mg/dL	49	955	192	1	0		70 tot <100 mg/dL	153	896	25	0	0
	100 tot <155 mg/dL	1	27	1183	104	0		100 tot <155 mg/dL	2	186	1284	10	0
	155 tot <190 mg/dL	0	0	4	170	30		155 tot <190 mg/dL	0	0	69	246	3
	>190 mg/dL	0	0	1	1	53		>190 mg/dL	0	0	2	20	80
TOTAAL	3446					TOTAAL	3446						
CONCORDANT%: 84,53						CONCORDANT%: 85,69							
DISCORDANT%: 15,38						DISCORDANT%: 14,19							
Majeure DISCORDANTIE% 0,09						Majeure DISCORDANTIE% 0,12							
SOM % 100,00						SOM % 100,00							

Concordantie-analyse in de validatiecohort met TG 200 - 400 mg/dL:

CONCORDANTIE-ANALYSE Friedewald versus Gemeten:

		D-LDL-C				
		<70 mg/dL	70 tot <100 mg/dL	100 tot <155 mg/dL	155 tot <190 mg/dL	>190 mg/dL
F-LDL-C	<70 mg/dL	34	45	3	0	0
	70 tot <100 mg/dL	0	44	46	0	0
	100 tot <155 mg/dL	0	0	85	27	0
	155 tot <190 mg/dL	0	0	1	12	8
	>190 mg/dL	0	0	0	0	5
	TOTAAL	310				

CONCORDANT%:	58,06
DISCORDANT%:	40,97
Majeure DISCORDANTIE%:	0,97
SOM %	100,00

CONCORDANTIE-ANALYSE Anandaraja versus Gemeten:

		D-LDL-C				
		<70 mg/dL	70 tot <100 mg/dL	100 tot <155 mg/dL	155 tot <190 mg/dL	>190 mg/dL
A-LDL-C	<70 mg/dL	32	38	2	0	0
	70 tot <100 mg/dL	2	45	39	0	0
	100 tot <155 mg/dL	0	6	91	25	0
	155 tot <190 mg/dL	0	0	3	12	6
	>190 mg/dL	0	0	0	2	7
	TOTAAL	310				

CONCORDANT%:	60,32
DISCORDANT%:	39,03
Majeure DISCORDANTIE%:	0,65
SOM %	100,00

CONCORDANTIE-ANALYSE Delta-LDL-C versus Gemeten:

		D-LDL-C				
		<70 mg/dL	70 tot <100 mg/dL	100 tot <155 mg/dL	155 tot <190 mg/dL	>190 mg/dL
Delta-LDL-C	<70 mg/dL	28	10	0	0	0
	70 tot <100 mg/dL	6	71	16	0	0
	100 tot <155 mg/dL	0	8	117	9	0
	155 tot <190 mg/dL	0	0	2	30	4
	>190 mg/dL	0	0	0	0	9
	TOTAAL	310				

CONCORDANT%:	82,26
DISCORDANT%:	17,74
Majeure DISCORDANTIE%:	0,00
SOM %	100,00

CONCORDANTIE-ANALYSE vereenvoudigde Delta-LDL-C versus Gemeten:

		D-LDL-C				
		<70 mg/dL	70 tot <100 mg/dL	100 tot <155 mg/dL	155 tot <190 mg/dL	>190 mg/dL
Vereenvoudigde Delta-LDL-C	<70 mg/dL	23	5	0	0	0
	70 tot <100 mg/dL	11	54	2	0	0
	100 tot <155 mg/dL	0	30	120	2	0
	155 tot <190 mg/dL	0	0	12	31	0
	>190 mg/dL	0	0	1	6	13
	TOTAAL	310				

CONCORDANT%:	77,74
DISCORDANT%:	21,94
Majeure DISCORDANTIE%:	0,32
SOM %	100,00

Concordantie-analyse in de validatiecohort met < TG 200 mg/dL:

CONCORDANTIE-ANALYSE Friedewald versus Gemeten:

		D-LDL-C				
		<70 mg/dL	70 tot <100 mg/dL	100 tot <155 mg/dL	155 tot <190 mg/dL	>190 mg/dL
F-LDL-C	<70 mg/dL	537	231	0	0	0
	70 tot <100 mg/dL	15	761	285	1	0
	100 tot <155 mg/dL	1	9	952	93	0
	155 tot <190 mg/dL	0	0	1	140	20
	>190 mg/dL	0	0	1	1	36
	TOTAAL	3084				

CONCORDANT%:	78,66
DISCORDANT%:	21,24
Majeure DISCORDANTIE%:	0,10
SOM %	100,00

CONCORDANTIE-ANALYSE Anandaraja versus Gemeten:

		LDL-C niveaus Gemeten				
		<70 mg/dL	70 tot <100 mg/dL	100 tot <155 mg/dL	155 tot <190 mg/dL	>190 mg/dL
A-LDL-C	<70 mg/dL	354	79	0	0	0
	70 tot <100 mg/dL	172	556	86	0	0
	100 tot <155 mg/dL	27	364	1030	53	0
	155 tot <190 mg/dL	0	2	118	152	9
	>190 mg/dL	0	0	5	30	47
	TOTAAL	3084				

CONCORDANT%:	69,36
DISCORDANT%:	29,54
Majeure DISCORDANTIE%:	1,10
SOM %	100,00