

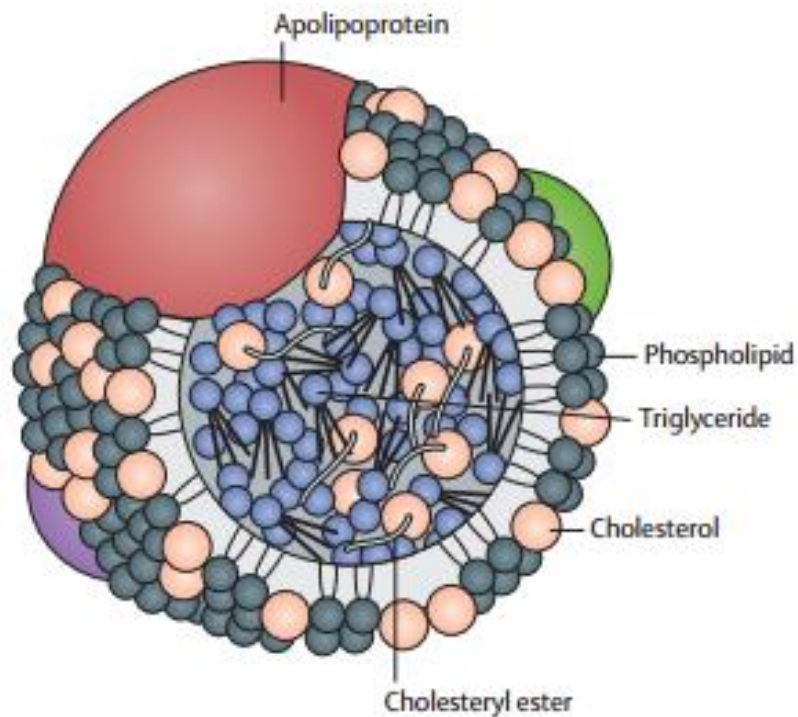
LDL-Cholesterol: Gemeten versus Berekende waarde

DORIEN VAN DEN BOSSCHE – ASO KLINISCHE BIOLOGIE
AZ DELTA KLINISCH LABORATORIUM – KLINISCHE CHEMIE
PROMOTOR: DR. D. DE SMET



- **LDL-Cholesterol**
 - ... en zijn Laboratoriumdiagnostiek
- **Questions**
 - *Welke methoden worden in de literatuur voorgesteld ter bepaling van LDL-C?*
 - *Welke implicaties kunnen worden verwacht wanneer de directe methode wordt ingeruild voor een gevalideerde formule in het AZ Delta ziekenhuis?*
- **Conclusie**

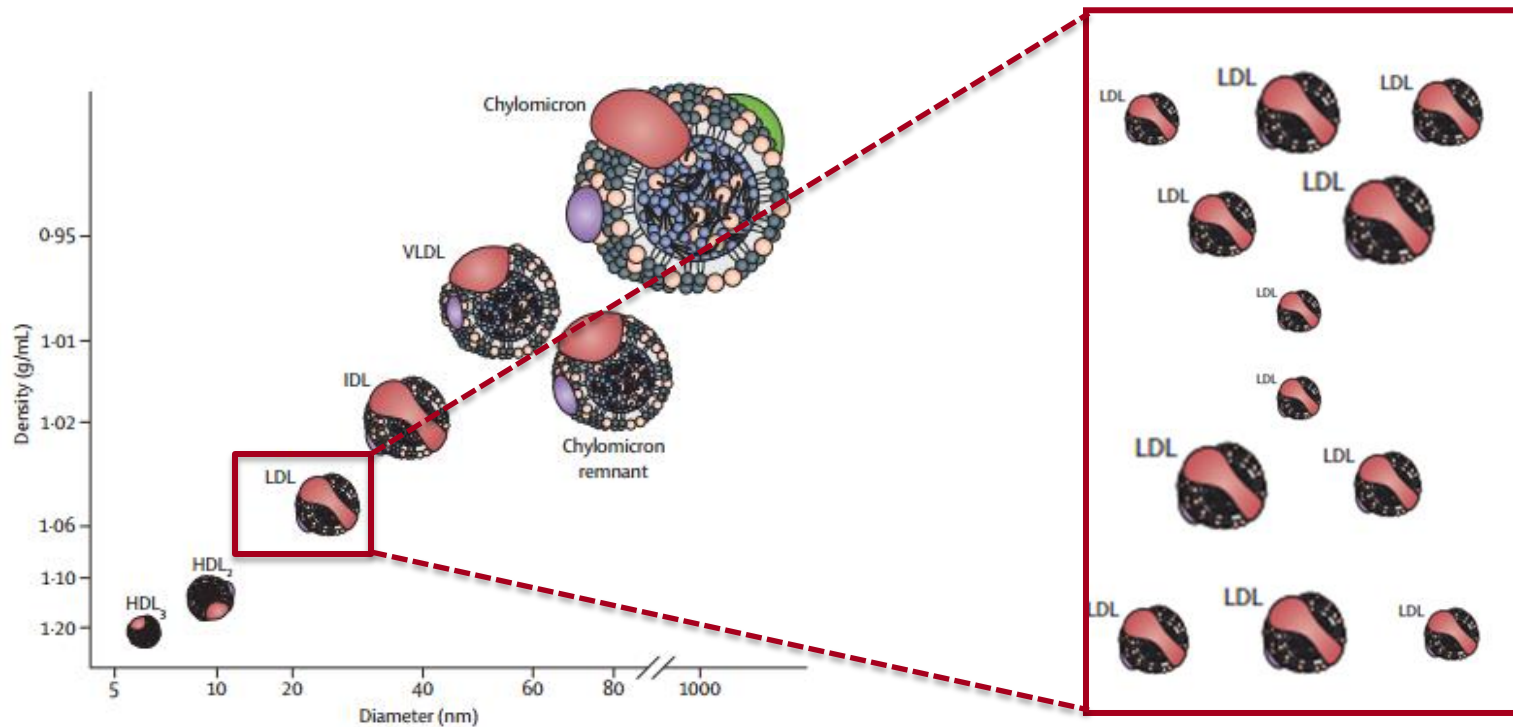
Transport van lipiden in plasma



Lipoproteïnen

- **Kern:**
 - Cholesterolesters
 - Triglyceriden
- **Enveloppe:**
 - Fosfolipiden
 - Cholesterol
- **Apolipoproteïne**

Indeling volgens grootte en densiteit



LDL Karakteristieken

- **Ultracentrifugatie:** “Broad cut LDL-fractie” met een densiteit tussen 1,006 – 1,063 kg/L
- **Heterogene groep** van subklassen met \neq in afmeting en densiteit
 - IDL met densiteit: 1,006 – 1,019 kg/L
 - LDL met densiteit: 1,019 – 1,063 kg/L
 - Lipoproteïn (a): LDL-like partikel: 1,05 – 1,12 kg/L (overlap LDL-HDL)
- “LDL-partikels” zijn vaak **gedefinieerd volgens de gebruikte techniek** (elektroforese, chromatografie en chemische precipitatie \neq ultracentrifugatie)

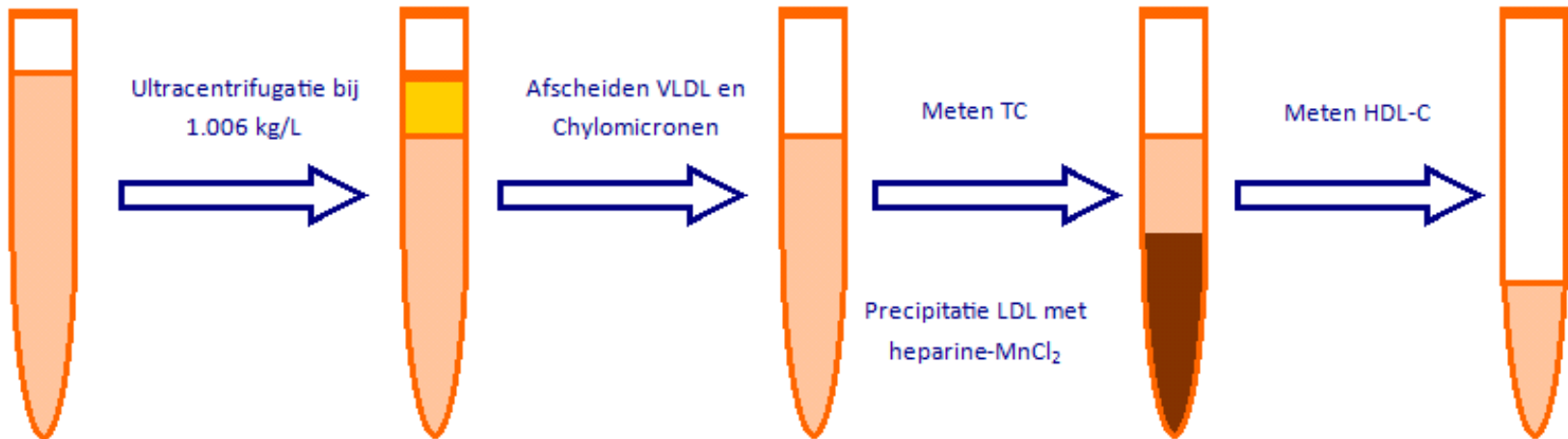
Question 1



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

Bepaling van LDL-C (1)

De Centers of Disease Control-
REFERENTIEMHODE:
Bèta-kwantificatie (BQ)



$$\text{LDL-C} = \text{TC} - \text{HDL-C}$$

Indirecte methoden

- **FRIEDEWALD FORMULE (1972)**
- Delong formule (1986)
- McNamara formule (1990)
- Anandaraja formule (2005)
- Vujovic formule (2010)
- Martin formule (2013)
- [Delta formule 2017 ??]

Directe methoden

- **Bèta-kwantificatie**
- Elektroforese
- Directe assay's:
 - 1^e Generatie
 - 2^e Generatie
 - 3^e Generatie

Friedewald formule (1972)

$$\text{LDL-C} = \text{TC} - \text{HDL-C} - \text{VLDL-C}$$
$$[\text{VLDL-C: TG}/5]$$

Assumpties:

- Constante TG:VLDL-C ratio in VLDL-partikels: 5:1
- Bij afwezigheid van Chylomicronen: meeste TG in VLDL-partikels aanwezig

Voordelen:

- Geen bewerkelijke ultracentrifugatie nodig

Nadelen:

- Niet betrouwbaar bij TG > 400 mg/dL – Hyperlipoproteïnemie Type III
- Minder accurate methode: accumulatie meetfouten van drie laboratoriumtesten
- Inschatting VLDL-C op basis van TG/5 niet zeer accuraat

Indirecte methoden

- **FRIEDEWALD FORMULE (1972)**
- Delong formule (1986)
- McNamara formule (1990)
- Anandaraja formule (2005)
- Vujovic formule (2010)
- Martin formule (2013)
- [Delta formule 2017 ??]

Directe methoden

- **Bèta-kwantificatie**
- Elektroforese
- Directe assay's:
 - 1^e Generatie: chemische precipitatie
 - 2^e Generatie: immunoseparatie
 - **3^e Generatie: Homogene enzymatisch colorimetrische assay's**

Directe methoden

Kyowa Medex

- HDL, VLDL and CM are blocked by surfactants and sugar compounds
- LDL are solubilized by Enzymes and Surfactants \longrightarrow Cholestenone + H₂O₂
 $2 \text{H}_2\text{O}_2 + 4\text{-AA} + \text{HSDA} + \text{Enzyme} \longrightarrow$ Color

Daiichi

- Surfactant 1 + Enzymes react only with HDL-C, VLDL-C and CM-C
 Peroxides created by Non-LDL are consumed by Peroxidase \longrightarrow Colorless
- LDL-C + Surfactant 2 + Coupler + Enzymes \longrightarrow Color

Wako

- LDL + Protecting Reagent protects LDL from enzyme reactions
 HDL-C, VLDL-C, CM-C + Enzymes \longrightarrow H₂O₂ + Catalase \longrightarrow H₂O
- LDL-Protecting Reagent + Deprotecting Reagent \longrightarrow LDL
 LDL-C + Enzymes \longrightarrow Cholestenone + H₂O₂
 $\text{H}_2\text{O}_2 + 4\text{-AA} + \text{HDAOS} \longrightarrow$ Color

Denka Seiken

- Non-LDL + Surfactant Combination 1 + Enzymes \longrightarrow Cholestenone + H₂O₂
 $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Catalase} \longrightarrow$ H₂O
- LDL-C + Surfactant Combination 2 \longrightarrow Cholestenone + H₂O₂
 Catalase + Azide \longrightarrow Inhibition
 $\text{H}_2\text{O}_2 + 4\text{-AA} + \text{HDAOS} + \text{Enzymes} \longrightarrow$ Color

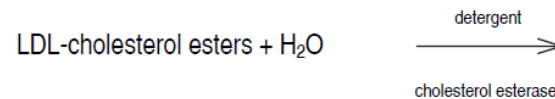
International Reagents Corporation

- LDL + Calixarene \longrightarrow LDL-Calixarene Soluble Complex
 Non-LDL + Enzymes (CE1) + Hydrazine \longrightarrow Cholestenone hydrazone
- LDL-C + B-NAD + Enzymes (CE2) \longrightarrow Cholestenone hydrazone + B-NADH

Test principle Roche Diagnostics

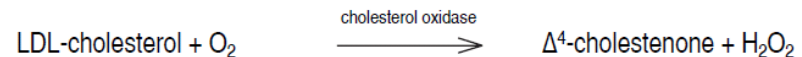
Homogeneous enzymatic colorimetric assay

Cholesterol esters and free cholesterol in LDL are measured on the basis of a cholesterol enzymatic method using cholesterol esterase and cholesterol oxidase in the presence of surfactants which selectively solubilize only LDL. The enzyme reactions to the lipoproteins other than LDL are inhibited by surfactants and a sugar compound. Cholesterol in HDL, VLDL and chylomicron is not determined.

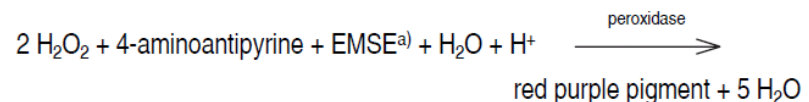


cholesterol + free fatty acids (selective micellar solubilization)

Cholesterol esters are broken down quantitatively into free cholesterol and fatty acids by cholesterol esterase.



In the presence of oxygen, cholesterol is oxidized by cholesterol oxidase to Δ^4 -cholestenone and hydrogen peroxide.



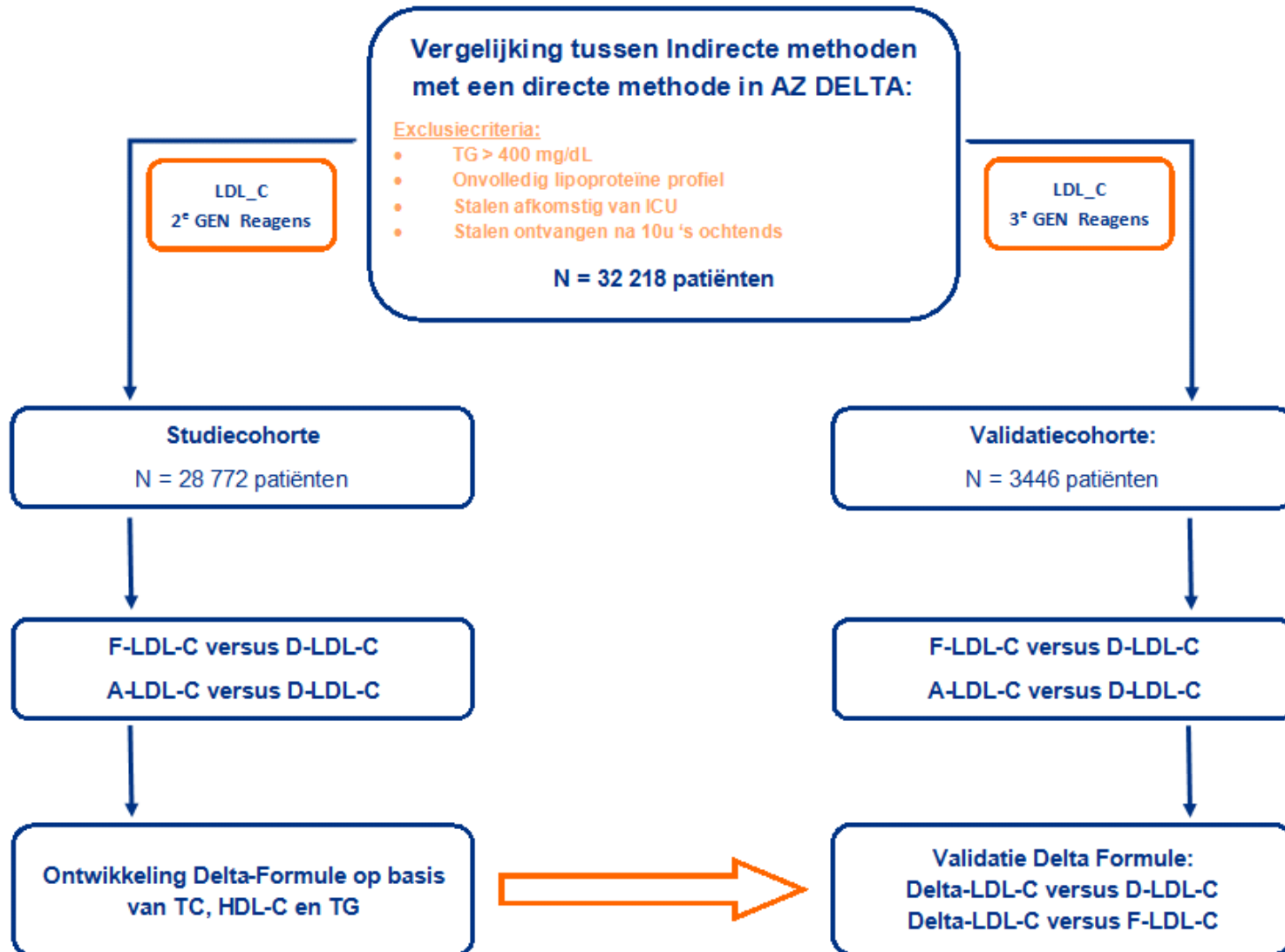
a) N-ethyl-N-(3-methylphenyl)-N-succinylethylenediamine

In the presence of peroxidase, the hydrogen peroxide generated reacts with 4-aminoantipyrine and EMSE to form a red purple dye. The color intensity of this dye is directly proportional to the cholesterol concentration and is measured photometrically.

Question 2



Welke implicaties kunnen worden verwacht wanneer de directe methode wordt ingeruild voor een gevalideerde formule in het AZ Delta Ziekenhuis?



Distributies in het lipidenprofiel van studiecohorten en validatiecohorten

Karakteristieken*	Studiecohorten	Validatiecohorten
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

Distributie van D-LDL-C, F-LDL-C en A-LDL-C in studiecohorte

Studiecohort	N	D-LDL-C (mg/dL) Mediaan (IQR)	F-LDL-C (mg/dL) Mediaan (IQR)	A-LDL-C (mg/dL) 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.

Mediane D-LDL-C significant hoger dan F-LDL-C in alle subjecten

Mediane D-LDL-C significant lager dan A-LDL-C in alle subjecten

Distributie van D-LDL-C, F-LDL-C en A-LDL-C in validatiecohort

Validatiecohort	N	D-LDL-C (mg/dL) Mediaan (IQR)	F-LDL-C (mg/dL) Mediaan (IQR)	A-LDL-C (mg/dL) 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)

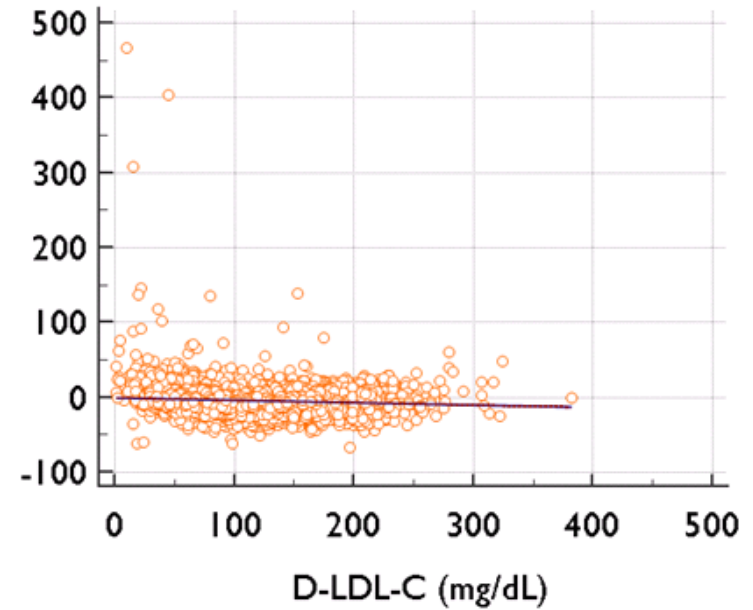
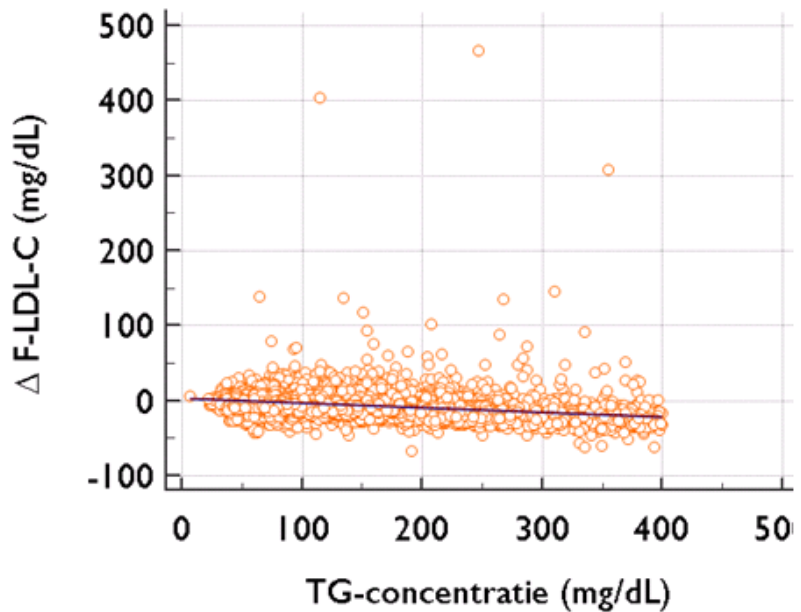
* *P*-waarde <0,001 met D-LDL-C als referentiemethode. *P*-waarden werden verkregen met de Wilcoxon-test en werden als statistisch significant beschouwd bij $p < 0.05$.

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.

Mediane D-LDL-C significant hoger dan F-LDL-C in alle subjecten

Mediane D-LDL-C significant lager dan A-LDL-C in alle subjecten

Absoluut verschil F-LDL-C t.o.v. D-LDL-C versus TG en LDL-C



Correlaties tussen indirecte en directe methode

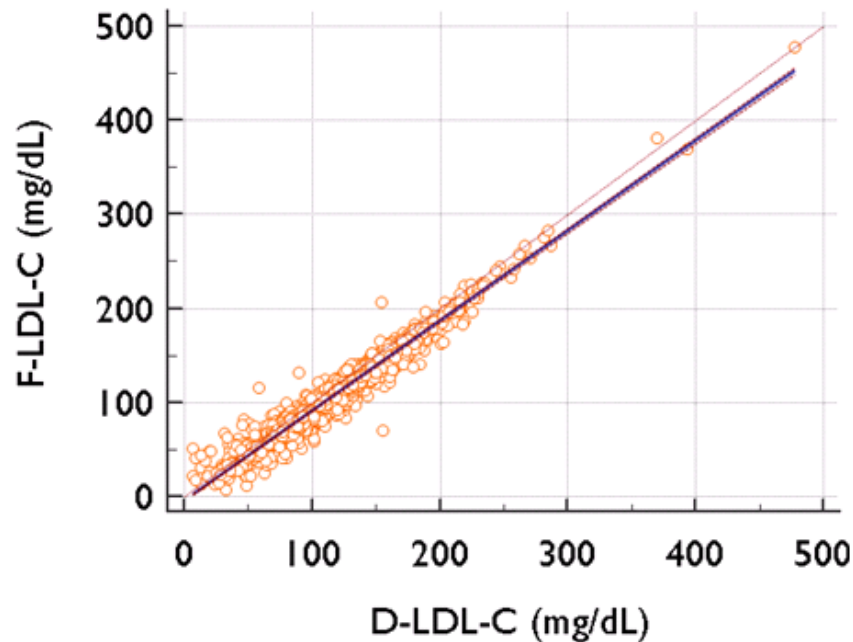
Spearman coëfficiënt studiecohort:

- F-LDL-C versus D-LDL-C: $r = 0,965$ (95%CI 0,964 -0,965)
- A-LDL-C versus D-LDL-C: $r = 0,857$ (95%CI 0,854 -0,860)

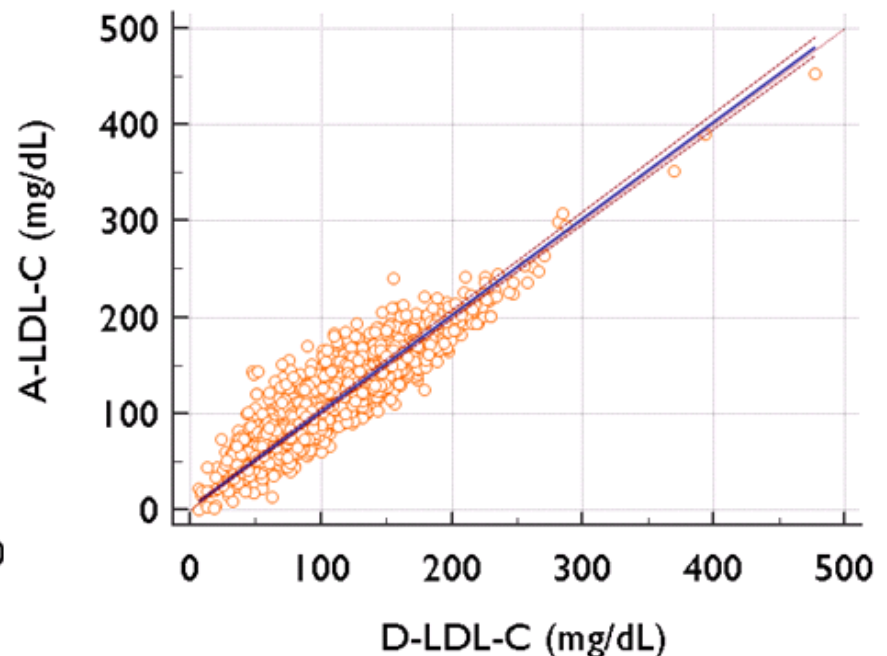
Spearman coëfficiënt validatiecohort:

- F-LDL-C versus D-LDL-C: $r = 0,975$ (95%CI 0,973 -0,976)
- A-LDL-C versus D-LDL-C: $r = 0,885$ (95%CI 0,878 -0,892)

Methodevergelijking tussen indirecte en directe methode



Passing&Bablok regressie-analyse tussen F-LDL-C en D-LDL-C: $Y = 0,9571 * X - 3,5129$
95%CI-interval richtingscoëfficiënt: 0,9508 - 0,9636
95%CI-interval intercept: -4,1473 - -2,8985



Passing&Bablok regressie-analyse tussen A-LDL-C en D-LDL-C: $Y = 1,0031 * X - 2,9878$
95%CI-interval richtingscoëfficiënt: 0,9876 - 1,0188
95%CI-interval intercept: 1,4660 - 4,5959

Opstelling van de eigen Delta-Formule uit studiecohorte

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

DELTA-FORMULE: $Y = 0,9264 * TC - 0,7621 * HDL-C - 0,09685 * TG - 8,6308$



Vereenvoudigde DELTA-FORMULE: $Y = TC - 0,8 * HDL-C - 0,1 * TG - 10$

Concordantie-analyse F-LDL-C en A-LDL-C versus D-LDL-C

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)

VALIDATIECOHORTE

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)

Concordantie-analyse Delta-LDL-C en vereenvoudigde Delta - LDL-C versus D-LDL-C in de validatiecohort

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)

- Goede correlatie tussen F-LDL-C en D-LDL-C, echter D-LDL-C waarden steeds hoger dan F-LDL-C → Discordanties in risicocategorieën: **Risico van de AZ-Delta patiënt op basis van D-LDL-C hoger dan F-LDL-C**
- Delta-LDL-C en D-LDL-C vertonen een goede correlatie
- Limitaties verbonden aan deze studie
 - Ontbreken van een vergelijking met de referentiemethode
 - Geen link met kliniek van de patiënt (To Do!): Quid gebruik van F-LDL-C en D-LDL-C in een gezonde versus dyslipidemische populatie
 - Voedingstatus van patiënt niet gekend

- Wat met het niet nuchter screenen van lipidenprofielen?
 - Toch voorkeur geven aan de directe methode??
 - Toevoegen van non-HDL-C waarde aan het rapport
 - Merker van alle atherogene cholesterolfracties in de bloedbaan
 - Niet afhankelijk van variaties in TG-waarden
- **Algemeen besluit AZ DELTA:**
 - **LDL-C rapporteren op basis van de Friedewald formule**
 - **Standaard non-HDL-C waarde rapporteren**

Bedankt voor uw aandacht!
Vragen?

The background features a white upper section and a lower section composed of several overlapping, curved shapes in various shades of red and orange, creating a dynamic, abstract design.