

helena | BioSciences
Europe
www.helena-biosciences.com

Helena BioSciences Europe
Colima Avenue
Sunderland Enterprise Park
Sunderland
SR5 3XB
tel: +44 (0) 191 549 6064
fax: +44 (0) 191 549 6271
email: info@helena-biosciences.com

Other Helena BioSciences Europe offices:

Helena BioSciences Europe
6 Rue Charles Cros-ZAE
95320 Saint Leu La Foret
France
tel: +33 13 995 9292
fax: +33 13 995 6891
email: helena@helena.fr

Helena BioSciences Europe
Via Enrico Fermi, 24
20090 Assago (Milano)
Italy
tel: +39 02 488 1951
or +39 02 488 2141
fax: +39 02 488 2677



HL-2-1306P 2003.08 (9)

helena | BioSciences
Europe
www.helena-biosciences.com

Instructions For Use

SAS-MX Lipoprotein
Cat. No. 101200

SAS-MX Lipoprotéine
Fiche technique
Réf. 101200

SAS-MX Lipoprotein
Anleitung
Kat. Nr. 101200

SAS-MX Lipoproteine
Istruzioni per l'uso
Cod. 101200

Lipoproteínas SAS-MX
Instrucciones de uso
N^o de catálogo 101200

Contents

English	1
Français	7
Deutsch	13
Italiano	19
Español	25

SAS-MX LIPOPROTEIN**INTENDED PURPOSE**

The SAS-MX Lipoprotein Kit is intended for the separation and quantitation of lipoproteins in serum or plasma by agarose gel electrophoresis.

Since Fredrickson and Lees proposed a system for phenotyping hyperlipoproteinaemia in 1965¹, the concept of coronary artery disease detection and prevention utilizing lipoprotein electrophoresis has become a relatively common test.

Epidemiological studies have related dietary intake of fats, especially cholesterol and blood levels of the lipids with the incidences of atherosclerosis, major manifestations of which are cardiovascular disease and stroke. Ischemic heart disease has also been related to hypercholesterolaemia^{2,3}. The need for accurate determination of lipoprotein phenotypes resulted from the recognition that hyperlipoproteinaemia is symptomatic of a group of disorders dissimilar in clinical features, prognosis and responsiveness to treatment. Since treatments of the disorders vary with the different phenotypes, it is absolutely necessary that the correct phenotype be established before therapy is begun⁴. In the classification system proposed by Fredrickson and Lees, only types II, III and IV have a proven relationship to atherosclerosis. Plasma lipids do not circulate freely in the plasma, but are transported bound to protein and can thus be classified as lipoproteins. The various fractions are made of different combinations of protein, cholesterol, glycerides, cholesterol esters, phosphatides and free fatty acids⁵. Several techniques have been employed to separate the plasma lipoproteins, including ultracentrifugation, thin layer chromatography, immunological techniques, and electrophoresis. Electrophoresis and ultracentrifugation are two of the most widely used methods and each has given rise to its own terminology. Table I shows the correlation of these classifications and the relative lipid and protein composition of each fraction.

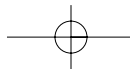
Classification according to:		Composition - % in each fraction			
Electrophoretic Mobility	Ultra-centrifuge	Protein	Glyceride	Cholesterol	Phospholipids
Chylomicrons		2%	98%		
Beta	LDL*	21%	12%	45%	22%
pre-Beta	VLDL*	10%	55%	13%	22%
Alpha	HDL*	50%	6%	18%	26%

*Nonstandard abbreviations: LDL (low density lipoprotein), VLDL (very low density lipoprotein), HDL (high density lipoprotein).

Various exceptions to the above classifications inevitably exist. One of these is the "sinking pre-beta", which is pre-beta migrating material which "sinks" in the ultracentrifuge along with the LDL (beta migrating) fraction⁶. This is the Lp(a) lipoprotein reported by Dahien⁷. It is considered a normal variant found in 10% of the population.

Another exception is the "floating beta", which is beta migrating materials "floating" in the ultracentrifuge with the VLDL.

This abnormal lipoprotein appears in Type III hyperlipoproteinaemias. Various types of support media have been used for the electrophoretic separation of lipoproteins. When Fredrickson originally devised the classification system, he used paper electrophoresis⁸. More recently agarose-gel, starch block and polyacrylamide gel have been used^{5,7}.



The SAS-MX Lipoprotein Kit separates serum / plasma lipoproteins according to charge in agarose gel. The lipoproteins are then fixed and stained for visualisation.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

All reagents are for in-vitro diagnostic use only. Do not ingest or pipette by mouth any kit component. Wear gloves when handling all kit components. Refer to the product safety data sheet for risk and safety phrases and disposal information.

COMPOSITION

1. SAS-MX Lipoprotein Gel

Contains agarose in a Tris / Barbitol buffer with sodium azide and thiomersal as preservative. The gel is ready for use as packaged.

2. Tris / Barbitol Buffer Concentrate

Contains concentrated Tris / Barbitol buffer with sodium azide as preservative. Dilute the contents of the bottle to 1 litre with purified water and mix well.

3. SAS-MX Lipoprotein Stain

Contains Fat Red 7B stain. Dissolve the contents of the vial in 1 litre of Methanol, stir for 24 hours and filter before use. Preparation of working stain: Immediately prior to use, add 5ml of purified water to 25ml of the stock stain. Add the water drop-wise with stirring.

4. Other Kit Components

Each kit contains Instructions For Use and sufficient Sample Application Templates and Blotters A and C to complete 10 gels.

STORAGE AND SHELF-LIFE

1. SAS-MX Lipoprotein Gel

Gels should be stored at 15...30°C and are stable until the expiry date indicated on the package. DO NOT REFRIGERATE OR FREEZE. Deterioration of the gel may be indicated by 1) crystalline appearance indicating the gel has been frozen, 2) cracking and peeling indicating drying of the gel or 3) visible contamination of the agarose from bacterial or fungal sources.

2. Tris / Barbitol Buffer

The buffer concentrate should be stored at 15...30°C and is stable until the expiry date indicated on the label. Diluted buffer is stable for 2 months at 15...30°C.

3. SAS-MX Lipoprotein Stain

The powdered stain should be stored at 15...30°C and is stable until the expiry date indicated on the label. Dissolved stain is stable for 6 months at 15...30°C. Store in a tightly stoppered bottle.

ITEMS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

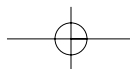
Cat. No. 4063 Chamber

Cat. No. 1525 EPS600 Power Supply

Drying oven with forced air capable of 60...70°C

Destain solution: mix 75ml of methanol and 25ml of purified water immediately before use.

Purified water



SAS-MX LIPOPROTEIN

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Fresh serum or EDTA anticoagulated plasma is the specimen of choice. Samples can be stored at 2...6°C for up to 5 days. DO NOT FREEZE.

Patient Preparation: For the most accurate phenotyping of lipoprotein patterns, the following precautions should be observed before sampling:

- 1) The patient should fast for a 12-14 hour period prior to sampling to prevent interference from meal-induced chylomicrons.
- 2) Discontinue all drugs for 3-4 weeks if possible.
- 3) The patient should be maintaining a stable weight and be on a normal diet for at least 1 week.
- 4) Wait 4-8 weeks after a myocardial infarction or similar traumatic episode.

Interfering Factors:

- 1) Heparin therapy can lead to alterations in the migration of the lipoproteins, particularly beta lipoprotein.
- 2) Samples should not be collected into heparin anticoagulant for similar reasons.

STEP-BY-STEP PROCEDURE

1. Remove the gel from the packaging and place on a paper towel. Blot the gel surface with a blotter C, discard the blotter.
2. Align the sample application template with the arrows at the edge of the gel. Place a blotter A on top of the template and rub a finger across the slits to ensure good contact. Remove the blotter and retain for use in step 5.
3. Apply 2µl of sample to each slit and allow to absorb for 7 minutes.
4. Whilst the sample is absorbing, pour 25ml of buffer into each inner section of the SAS-MX Chamber.
5. Following sample absorption, blot the template with the blotter A retained from Step 2 and remove both blotter and template.
6. Position the gel in the chamber agarose side up, aligning the positive (+) and negative (-) sides with the corresponding positions on the chamber.
7. Electrophorese the gel: 80 volts, 45 minutes.
8. Following electrophoresis, dry the gel at 60...70°C.
9. Place the dry gel in a staining dish and carefully pour the 30ml of freshly prepared working stain onto the gel. Stain for 2 minutes.
10. Destain the gel in 2 x 15-30 seconds washes of destain solution.
11. Wash the gel briefly in purified water and dry.

INTERPRETATION OF RESULTS

It is recommended that any evaluation of the gels is performed against normal values produced for this method in each individual laboratory.

1. **Qualitative Evaluation:** Visually inspect the gels for the presence or absence of particular bands of interest.
2. **Quantitative Evaluation:** Scan the gels gel side down at 525nm.

The alpha-lipoprotein (HDL) is the fastest moving fraction and migrates furthest towards the anode. The beta-lipoprotein (LDL) band is usually the most prominent fraction, migrating closest to the application point. Pre-beta lipoprotein (VLDL) migrates between the alpha and beta lipoproteins. The mobility of the pre-beta lipoprotein varies with the degree of resolution obtained, the type of pre-beta present, and the amount of beta-lipoproteins present. Sometimes, the pre-beta will appear as a smear just in front of the beta-lipoproteins, other times it may split in to 2 separate fractions or may be lacking altogether. The integrity of the pre-beta fraction decreases with sample age. Chylomicrons, when present, remain at the application point.

Calculating the amount of each lipid fraction as mg/dL or mmol/L is not recommended (see LIMITATIONS).

A normal fasting serum can be defined as a clear serum with negligible chylomicrons and normal cholesterol and triglyceride levels. On electrophoresis, the beta-lipoprotein appears as the major fraction with the pre-beta lipoprotein faint or absent and the alpha-lipoprotein band definite but less intense than the beta.

A patient must have an elevated cholesterol or triglycerides to have hyperlipoproteinaemia. The elevation must be determined to be primary or secondary to metabolic disorders such as hypothyroidism, obstructive jaundice, nephrotic syndrome, dysproteinemias, or poorly controlled insulinopaenic diabetes mellitus.

Primary lipidaemia arises from genetically determined factors or environmental factors of unknown mechanism such as diet, alcohol intake and drugs, especially oestrogen or steroid hormones¹². Also considered primary are those lipoproteinaemias associated with ketosis-resistant diabetes, pancreatitis and obesity. Diabetes mellitus and pancreatitis can be confusing, for it is often difficult to tell whether the hyperlipoproteinaemia or the disease is the causative factor.

For a complete review of Lipoprotein phenotyping, with descriptions of the criteria, see Fredrickson, D.S. and Lees, R.S.^{1,8}.

Marked increases in the alpha lipoproteins are seen in obstructive liver disease and cirrhosis. Marked decreases are seen in parenchymal liver disease. Tangier's disease is a rare genetic disorder characterised by the total absence of normal alpha lipoproteins. Heterozygotes exhibit decreased levels of alpha lipoproteins. It should be noted that hyperoestrogenaemia (pregnancy and oral contraceptive use) may cause moderate elevations in the alpha lipoproteins¹².

Abetalipoproteinaemia is a primary inherited defect characterised by severe deficiency of all lipoproteins of density less than 1.063 (all but the alpha lipoproteins). It is accompanied by numerous clinical symptoms and life expectancy is limited. A few cases of familial hypobetalipoproteinaemia have been reported. There is some evidence that the mutation is different from that producing abetalipoproteinaemia.

Lipoprotein-X is an abnormal lipoprotein often seen in patients with obstructive liver disease. It consists of unesterified (free) cholesterol, phospholipids, and VLDL protein. It migrates slower than LDL. Because of its particular lipid content, it stains poorly or not at all with the usual lipid stains and so is not usually detected by standard lipoprotein electrophoresis. Lipoprotein-X is clearly visible when using cholesterol-specific enzymatic staining methods.

SAS-MX LIPOPROTEIN

QUALITY CONTROL

The Lipotrol Control (Cat. No. 5069) can be used to verify all phases of the procedure and should be used on each plate run. Refer to the package insert provided with the control for acceptable assay values.

LIMITATIONS

Fat Red 7B, as well as the Sudan fat stains, has a much greater affinity for triglycerides and cholesterol esters than it has for free cholesterol and phospholipids. Bands seen after staining with these dyes do not reflect a true quantitation of the total plasma lipids¹⁰.

Since the lipid composition of each lipoprotein fraction is variable, it is essential to determine the total cholesterol and triglyceride levels before attempting to classify a pattern^{8,9}. When it comes to diagnosing or ruling out a Type III hyperlipoproteinaemia, a more definitive quantitation of the lipoproteins such as ultracentrifugation¹¹ or PAGE electrophoresis¹¹ is essential.

REFERENCE VALUES

It is recommended that any evaluation of the gels is performed against normal values which have been produced for this test in each individual laboratory.

A normal range study was performed using samples from 48 apparently healthy male and female volunteers:

Fraction	Range
Alpha Lipoproteins	14 - 46%
Pre-Beta Lipoproteins	6 - 40%
Beta Lipoproteins	28 - 61.7%
Chylomicrons	0 - 2%

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Within-Run Precision: 8 replicates of the same sample on a single gel.

Fraction	Mean (%)	CV (%)
Alpha Lipoprotein	26.3	5.2
Pre-Beta Lipoprotein	29.4	4.0
Beta Lipoprotein	44.4	4.3

Between-Run Precision: A single sample run on 10 different gels.

Fraction	Mean (%)	CV (%)
Alpha Lipoprotein	25.2	9.0
Pre-Beta Lipoprotein	34.7	4.2
Beta Lipoprotein	44.0	2.7

BIBLIOGRAPHY

1. Fredrickson, D.S and Lees, R.S. 'A System For Phenotyping Hyperlipoproteinemias', Circulation, 1965; 31(3) : 321-327.
2. Henry, R.J. Ed., 'Clinical Diagnosis and Management of Laboratory Methods', 17th Ed., W.B. Saunders & Co., New York, 194-201, 1984.
3. Lewis, L.A. and Oppet, J.J. Ed., 'CRC Handbook of Electrophoresis Vol II Lipoproteins in Disease', CRC Press Inc., Florida, 63-239, 1980.
4. Levy, R.I. and Fredrickson, D.S. 'Diagnosis and Management of Hyperlipoproteinemia', Am. J. Cardiol., 1968; 22(4) : 576-583.
5. Houstmuller, A.J., 'Agarose-gel Electrophoresis of Lipoproteins: A Clinical Screening Test', Koninklijke Van Gorcum and Comp., The Netherlands, p5, 1969.
6. Stonde, N.J. and Levy, R.I. 'The Hyperlipidemias and Coronary Artery Disease', Disease-A-Month, 1972.
7. Dahlen, G. 'The Pre-Beta Lipoprotein Phenomenon in Relation to Serum Cholesterol and Triglyceride Levels: The Lp(a) Lipoprotein and Coronary Heart Disease', Umea University Medical Dissertations, Sweden, No. 20, 1974.
8. Fredrickson, D.S., Levy, R.I. and Lees, R.S., 'Fat Transport in Lipoproteins - An Integrated Approach To Mechanisms and Disorders' N. Eng. J. Med., 1967; 276 : 34-42, 94-103, 148-156, 215-226, 273-281.
9. Fredrickson, D.S. 'When To Worry About Hyperlipidemia', Consultant, December 1974.
10. Davidsohn, I. And Henry, J.B., Todd-Sanford: 'Clinical Diagnosis by Laboratory Methods', 15th ed., p 639, 1974.
11. Masket, B.H., Levy, R.I and Fredrickson, D.S., 'The Use Of Polyacrylamide Gel Electrophoresis in Differentiating Type III Hyperlipoproteinemia', J. Lab. Clin. Med., 1973; 81(5) : 794-802.
12. World Health Organisation Memorandum: Classification of Hyperlipidemias and Hyperlipoproteinemias', Circulation, 1972; 45 : 501-508.

SAS-MX LIPOPROTÉINE**UTILISATION**

Le kit SAS-MX lipoprotéine est destiné à la séparation et la quantification des lipoprotéines du sérum ou du plasma par électrophorèse en gel d'agarose.

Depuis que Fredrickson et Lees ont proposé une classification des phénotypes de l'hyperlipoprotéinémie en 1965¹, la détection et la prévention des maladies des artères coronaires grâce à l'électrophorèse des lipoprotéines constituent un test relativement courant.

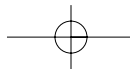
Des études épidémiologiques ont montré qu'il existe un rapport entre une diète riche en graisse (en particulier en cholestérol) et un taux de lipides sanguins élevé, et la fréquence des artérioscléroses dont les maladies cardiovasculaires et l'infarctus du myocarde sont les principales manifestations. Il a aussi été établi qu'il existe un rapport entre l'ischémie cardiaque et l'hypercholestérolémie^{2,3}. La nécessité de déterminer de façon exacte le phénotype des lipoprotéines vient du fait qu'il est connu que l'hyperlipoprotéinémie est symptomatique d'un groupe de pathologies différentes au niveau des manifestations cliniques, du pronostic et de la réponse au traitement. Étant donné que la thérapie varie en fonction des différents phénotypes, il est absolument nécessaire de connaître le phénotype exact avant de commencer tout traitement⁴. Dans la classification proposée par Fredrickson et Lees, le rapport avec l'artériosclérose n'a été démontré que pour les types II, III et IV. Les lipides plasmatiques ne circulent pas librement car ils sont fixés à une protéine; il est donc possible de les classer dans la catégorie des lipoprotéines. Les diverses fractions sont formées de différentes combinaisons de protéines, de cholestérol, de glycérides, d'esters de cholestérol, de phosphatides et d'acides gras libres⁵. Plusieurs techniques, comme l'ultracentrifugation, la chromatographie sur couche mince, les méthodes immunologiques et l'électrophorèse, sont utilisées pour séparer les lipoprotéines plasmatiques. L'électrophorèse et l'ultracentrifugation sont les deux méthodes les plus communément utilisées et chacune dispose de sa propre terminologie. Le tableau I indique la corrélation entre ces classifications et la composition relative en lipides et en protéines de chaque fraction.

Classification suivant la technique de:		Composition (en % de chaque fraction)			
Mobilité électrophorétique	Ultra-centrifugation	Protéine	Glycérine	Cholestérol	Phospholipides
Chylomicrons		2%	98%		
Bêta	LDL*	21%	12%	45%	22%
Pré-bêta	VLDL*	10%	55%	13%	22%
Alpha	HDL*	50%	6%	18%	26%

* Abréviations: LDL (lipoprotéine de basse densité), VLDL (lipoprotéine de très basse densité), HDL (lipoprotéine de haute densité).

Il existe inévitablement plusieurs exceptions à la classification ci-dessus. L'une d'elles est une fraction migrant en pré-bêta mais qui en ultracentrifugation avoisine la fraction LDL (fraction bêta)⁶. Il s'agit de la lipoprotéine Lp(a) décrite par Dahien⁷. Elle est considérée comme un variant normal retrouvé dans 10% de la population. La « bêta flottante » constitue une autre exception: elle migre en bêta mais est proche des VLDL en ultracentrifugation.

Cette lipoprotéine anormale apparaît dans les hyperlipoprotéinémies de type III. Divers supports d'électrophorèse ont été utilisés pour la séparation des lipoprotéines. Lorsque Fredrickson a réalisé sa classification, il utilisait l'électrophorèse sur papier⁸. Plus récemment, ce sont les gels d'agarose, d'amidon et de polyacrylamide qui sont utilisés^{3,7}.



Le kit SAS-MX lipoprotéine sépare les lipoprotéines plasmatiques ou sériques en fonction de leur charge en gel d'agarose. Elles sont ensuite fixées et colorées afin de les lire.

PRÉCAUTIONS

Tous les réactifs sont à usage diagnostic in-vitro uniquement. Ne pas ingérer ou pipeter à la bouche aucun composant. Porter des gants pour la manipulation de tous les composants. Se reporter aux fiches de sécurité des composants du kit pour la manipulation et l'élimination.

COMPOSITION

1. Plaque SAS-MX lipoprotéine

Contient de l'agarose dans un tampon Tris / Barbitol additionné de thimérosal et d'azide de sodium comme conservateurs. Le gel est prêt à l'emploi.

2. Tampon concentré Tris / Barbitol

Contient un tampon Tris / Barbitol concentré additionné d'azide de sodium comme conservateur. Diluer le contenu du flacon dans 1 litre d'eau distillée et bien mélanger.

3. Colorant SAS-MX lipoprotéine

Contient du colorant Fat Red 7B. Dissoudre le contenu du flacon dans 1 litre de méthanol et laisser sous agitation pendant 24 heures, puis filtrer avant utilisation. Préparation de la solution colorante de travail: juste avant l'utilisation, additionner 5ml d'eau distillée à 25ml de solution mère de colorant. Ajouter l'eau goutte à goutte sous agitation.

4. Autres composants du kit

Chaque kit contient également une fiche technique, des buvards A et C et des masques applicateur échantillons (Template) pour 10 gels.

STOCKAGE ET CONSERVATION

1. Plaque SAS-MX lipoprotéine

Les gels doivent être conservés entre 15...30°C; ils sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage. NE PAS RÉFRIGÉRER OU CONGELER. Les conditions suivantes indiquent une détérioration du gel: 1) des cristaux visibles indiquant que le gel a été congelé, 2) des craquelures indiquant une déshydratation du gel, 3) une contamination visible, bactérienne ou fongique.

2. Tampon Tris / Barbitol

Le tampon concentré doit être conservé entre 15...30°C; il est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Après reconstitution, le tampon est stable 2 mois entre 15...30°C.

3. Colorant SAS-MX lipoprotéine

Le colorant en poudre doit être conservé entre 15...30°C; il est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Après reconstitution, le tampon est stable 6 mois entre 15...30°C. Conserver en bouteille hermétiquement fermée.

MATÉRIELS NÉCESSAIRES NON FOURNIS

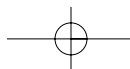
Réf. 4063 Chambre de migration

Réf. 1525 Générateur EPS600

Étuve de séchage à convection forcée offrant une température entre 60...70°C

Solution décolorante: mélanger 75ml de méthanol avec 25ml d'eau distillée juste avant utilisation.

Eau distillée



SAS-MX LIPOPROTÉINE

PRÉLÈVEMENTS DES ÉCHANTILLONS

L'utilisation de sérum fraîchement prélevé ou de plasma sur EDTA est fortement recommandée. Les échantillons peuvent être conservés 5 jours entre 2...6°C. NE PAS CONGELER.

Préparation du patient: Afin d'obtenir le phénotype lipoprotéinique le plus exact possible, les conditions suivantes doivent être observées avant le prélèvement:

- 1) Le patient doit être à jeun 12 à 14 heures avant le prélèvement, afin d'éliminer l'interférence avec les chylomicrons induits par l'alimentation.
- 2) Arrêter, si possible, la prise de médicaments 3 à 4 semaines avant le prélèvement.
- 3) Il convient que le patient ait un poids stable et suive un régime alimentaire normal au moins une semaine avant le prélèvement.
- 4) Attendre au moins 4 à 8 semaines après un infarctus du myocarde ou traumatisme similaire.

Facteurs interférents:

- 1) Il est possible qu'une héparinothérapie altère la migration des lipoprotéines, en particulier des bêta-lipoprotéines.
- 2) Les échantillons ne doivent pas être prélevés sur héparine pour des raisons similaires.

MÉTHODOLOGIE

1. Sortir le gel de son emballage et le déposer sur un papier absorbant. Sécher la surface du gel à l'aide d'un buvard C, jeter le buvard.
2. Disposer le masque applicateur échantillon en faisant correspondre les flèches avec les 2 fentes latérales. Placer un buvard A sur le masque et passer délicatement le doigt sur les fentes afin d'assurer un contact optimal. Retirer le buvard A et le conserver pour l'étape 5.
3. Déposer 2µl d'échantillon sur chaque fente et laisser absorber 7 minutes.
4. Pendant ce temps, verser 25ml de tampon dans chaque compartiment intérieur de la chambre de migration SAS-MX.
5. Une fois l'absorption de l'échantillon terminée, sécher le masque applicateur avec le buvard A conservé à l'étape 2 puis enlever le buvard et le masque applicateur.
6. Placer le gel, agarose vers le haut, dans la chambre de migration, en respectant les polarités.
7. Faire migrer à 80 volts pendant 45 minutes.
8. Une fois l'électrophorèse terminée, sécher le gel entre 60...70°C.
9. Placer le gel sec dans un bac de coloration et verser, en faisant attention, 30ml de colorant de travail fraîchement préparé sur le gel. Laisser colorer pendant 2 minutes.
10. Décolorer le gel dans 2 bains successifs de 15-30 secondes de solution décolorante.
11. Rincer rapidement sous un jet d'eau distillée et sécher.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Il est recommandé de réaliser chaque évaluation en comparant les gels à un modèle normal obtenu dans les mêmes conditions pour chaque laboratoire.

1. Évaluation qualitative: Une inspection visuelle permet de déterminer si les bandes d'une protéine spécifique sont présentes ou non.

2. Évaluation quantitative: Lire la plaque de gel, agarose vers le bas, à 525nm.

L'alpha-lipoprotéine (HDL) est la fraction la plus rapide et migre vers l'anode. La bande bêta-lipoprotéine (LDL), généralement la fraction la plus importante, migre très près du point d'application. Les pré-bêta lipoprotéines (VLDL) migrent entre les alpha et les bêta lipoprotéines. La mobilité des pré-bêta lipoprotéines varie en fonction de la résolution obtenue, du type de pré-bêta présentes et de la quantité de bêta-lipoprotéines présentes. Parfois la bande pré-bêta apparaît sous la forme d'une fine bande juste devant les bêta-lipoprotéines; d'autres fois, l'écart entre les fractions est important ou elles se confondent. L'intégrité de la fraction pré-bêta diminue très vite avec le vieillissement de l'échantillon. Les chylomicrons, s'ils sont présents, restent au point d'application.

Le calcul de chaque fraction en mg/dl ou mmol/l n'est pas recommandée (cf. LIMITES).

Un sérum normal à jeun est un sérum clair avec une quantité négligeable de chylomicrons et des taux normaux de cholestérol et de triglycérides. Sur l'électrophorèse, la bêta-lipoprotéine est la fraction la plus importante avec une absence ou une faible bande de pré-bêta lipoprotéines et une bande d'alpha-lipoprotéines bien définie mais moins intense que celles des bêta-lipoprotéines.

Une hyperlipoprotéïnémie se caractérise par un taux élevé de cholestérol ou de triglycérides. Il faut déterminer si ce taux élevé est la cause ou la conséquence de désordres métaboliques: hypothyroïdie, ictère par rétention, syndrome néphrotique, dysprotéïnémie ou un diabète insulinodépendant mal contrôlé.

Une hyperlipidémie principale provient de facteurs génétiques ou de facteurs environnementaux aux mécanismes inconnus comme le régime alimentaire, la consommation d'alcool et de médicaments (en particulier les œstrogènes et les hormones stéroïdiennes)¹². Les lipoprotéïnémies associées à un diabète non insulinodépendant, à une pancréatite et à l'obésité sont également considérées comme des facteurs déterminants. Pour ce qui est du diabète et de la pancréatite, il est possible que les résultats soient confus et il est difficile de dire si c'est l'hyperlipoprotéïnémie ou la maladie qui est le facteur causal.

Pour avoir des détails sur les phénotypes des lipoprotéines, avec description des critères, voir Fredrickson, D. S. et Lees, R. S.^{1,8}.

Une augmentation de l'alpha-lipoprotéine est observée dans les maladies obstructives du foie ou les cirrhoses. Une diminution est observée dans les maladies du parenchyme du foie. La maladie de Tangier est un désordre génétique rare, caractérisé par une absence totale d'alpha-lipoprotéines. On observe chez les hétérozygotes un taux inférieur à la normale d'alpha-lipoprotéines⁹. Il est à noter que l'hyperœstrogénémie (grossesse ou prise de contraceptifs oraux) peut provoquer une augmentation modérée du taux d'alpha-lipoprotéines¹².

L'abêtalipoprotéïnémie est un défaut héréditaire se caractérisant par une carence grave de toutes les lipoprotéines de densité inférieure à 1,063 (toutes sauf les alpha-lipoprotéines). Elle est accompagnée de nombreux symptômes cliniques et l'espérance de vie est limitée. Quelques cas d'hypobêtalipoprotéïnémie familiale ont été documentés. La mutation génétique est différente de celle dont résulte l'abêtalipoprotéïnémie⁸.

SAS-MX LIPOPROTÉINE

La lipoprotéine-X est une lipoprotéine anormale souvent observée chez des patients avec une maladie obstructive du foie. Elle est constituée de cholestérol non estérifié (libre), de phospholipides et de protéines VLDL. Elle migre plus lentement que les LDL. De part la particularité de sa composition, elle est très faiblement colorée ou non colorée par les colorants des lipides classiques et n'est généralement pas détectée par les méthodes standard d'électrophorèse des lipoprotéines. Elle est bien visible moyennant coloration avec un réactif enzymatique du cholestérol.

CONTRÔLE QUALITÉ

Le contrôle Lipotrol (Réf. 5069) peut être utilisé afin de vérifier toutes les phases de la technique et doit être déposé sur chaque plaque. La notice correspondante indique les valeurs appropriées du dosage.

LIMITES

Le Fat Red 7B ainsi que le Noir Soudan ont une plus grande affinité avec les triglycérides, les esters du cholestérol qu'avec le cholestérol libre ou les phospholipides. Les bandes observées avec ces colorants ne reflètent pas la quantité réelle des lipides totaux du plasma¹⁰.

Comme la composition de chaque fraction de lipoprotéine est variable, il est primordial de doser le cholestérol total et les triglycérides avant de classifier l'échantillon⁹. Lorsqu'il faut diagnostiquer ou écarter une hyperlipoprotéïnémie de type III, il est essentiel de réaliser une quantification par ultracentrifugation¹¹ ou par électrophorèse PAGE¹.

VALEURS DE RÉFÉRENCE

Il est recommandé de réaliser chaque évaluation en comparant les gels à un modèle normal obtenu dans les mêmes conditions pour chaque laboratoire.

Des valeurs de références ont été obtenues à partir de 48 volontaires, hommes et femmes, apparemment en bonne santé:

Fraction	Intervalle
Alpha-lipoprotéines	14 – 46%
Pré-bêta lipoprotéines	6 – 40%
Bêta lipoprotéines	28 – 61.7%
Chylomicrons	0 – 2%

PERFORMANCES

Précision intra-plaque: un échantillon déposé 8 fois sur le même gel.

Fraction	Moyenne (%)	CV (%)
Alpha-lipoprotéine	26,3	5,2
Pré-bêta lipoprotéine	29,4	4,0
Bêta lipoprotéine	44,4	4,3

SAS-MX LIPOPROTEIN

Précision inter-plaques: un échantillon déposé sur 10 gels différents.

Fraction	Moyenne (%)	CV (%)
Alpha-lipoprotéine	25,2	9,0
Pré-béta lipoprotéine	34,7	4,2
Béta lipoprotéine	44,0	2,7

BIBLIOGRAPHIE

1. Fredrickson, D.S et Lees, R.S. 'A System For Phenotyping Hyperlipoproteinemias', Circulation, 1965 ; 31(3) : 321-327.
2. Henry, R.J. Ed., 'Clinical Diagnosis and Management of Laboratory Methods', 17^e éd., W.B. Saunders & Co., New York, 194-201, 1984.
3. Lewis, L.A. et Oppet, J.J. Ed., 'CRC Handbook of Electrophoresis Vol II Lipoproteins in Disease', CRC Press Inc., Floride, 63-239, 1980.
4. Levy, R.I. et Fredrickson, D.S. 'Diagnosis and Management of Hyperlipoproteinemia', Am. J. Cardiol., 1968 ; 22(4) : 576-583.
5. Houstmuller, A.J., 'Agarose-gel Electrophoresis of Lipoproteins: A Clinical Screening Test', Koninklijke Van Gorcum and Comp., Hollande, p 5, 1969.
6. Stonde, N.J. et Levy, R.I. 'The Hyperlipidemias and Coronary Artery Disease', Disease-A-Month, 1972.
7. Dahlen, G. 'The Pre-Beta Lipoprotein Phenomenon in Relation to Serum Cholesterol and Triglyceride Levels: The Lp(a) Lipoprotein and Coronary Heart Disease', Umea University Medical Dissertations, Suède, n°. 20, 1974.
8. Fredrickson, D.S., Levy, R.I. et Lees, R.S., 'Fat Transport in Lipoproteins - An Integrated Approach To Mechanisms and Disorders' N. Eng. J. Med., 1967 ; 276 : 34-42, 94-103, 148-156, 215-226, 273-281.
9. Fredrickson, D.S. 'When To Worry About Hyperlipidemia', Consultant, décembre 1974.
10. Davidsohn, I. et Henry, J.B., Todd-Sanford: 'Clinical Diagnosis by Laboratory Methods', 15^e éd., p 639, 1974.
11. Masket, B.H., Levy, R.I et Fredrickson, D.S., 'The Use Of Polyacrylamide Gel Electrophoresis in Differentiating Type III Hyperlipoproteinemia', J. Lab. Clin. Med., 1973 ; 81(5) : 794-802.
12. Mémoire de l'Organisation mondiale de la santé : Classification of Hyperlipidemias and Hyperlipoproteinemias', Circulation, 1972 ; 45 : 501-508.

ANWENDUNGSBEREICH

Das SAS-MX Lipoprotein Kit dient der Trennung und Quantifizierung von Lipoproteinen im Serum oder Plasma durch Elektrophorese im Agarose-Gel.

Seitdem Fredrickson und Lees 1965¹ ein System zur Phänotypisierung von Hyperlipoproteinämien vorgeschlagen hatten, gilt die Idee, die koronare Herzkrankheit mit Hilfe der Lipoprotein-Elektrophorese zu erkennen und zu verhindern als verhältnismäßig gängige Methode.

Epidemiologische Studien haben die Aufnahme von Fetten in der Ernährung, insbesondere Cholesterin, und der Lipidspiegel im Blut mit dem Auftreten von Atherosklerose in Verbindung gebracht, dessen Haupterscheinungsbild Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Schlaganfall sind. Auch die ischämische Herzkrankheit hat man mit Hypercholesterinämie^{2,3} in Verbindung gebracht. Der Bedarf für eine korrekte Bestimmung von Lipoproteinphänotypen ergab sich aus der Erkenntnis, dass die Hyperlipoproteinämie symptomatisch für eine Gruppe von Erkrankungen steht, die sich im klinischen Erscheinungsbild, in der Prognose und Behandlungsreaktion unterscheiden. Da die Behandlungen der Funktionsstörungen entsprechend der verschiedenen Phänotypen variieren, ist es absolute erforderlich, dass der korrekte Phänotyp vor Therapiebeginn bestimmt wird⁴. In dem von Fredrickson und Lees vorgeschlagenen Klassifizierungssystem haben nur die Typen II,III und IV eine nachweisliche Verbindung zur Atherosklerose. Plasmalipide liegen nicht ungebunden im Plasma vor, sondern werden an Proteinen gebunden transportiert und können so als Lipoproteine klassifiziert werden. Die unterschiedlichen Fraktionen bestehen aus verschiedenen Kombinationen von Protein, Cholesterin, Glyceriden, Cholesterinester, Phosphatiden und freien Fettsäuren. Es sind schon mehrere Verfahren zur Auftrennung der Plasmaproteine eingesetzt worden, insbesondere die Ultrazentrifugation, Dünnschichtchromatografie, immunologische Techniken und die Elektrophorese. Elektrophorese und Ultrazentrifugation sind zwei der am häufigsten gebrauchten Verfahren und jedes hat zu einer eigenen Terminologie geführt. Tabelle I zeigt die Korrelation dieser Klassifikationen und die relative Lipid- und Protein-Struktur der einzelnen Fraktionen.

Klassifikation nach:		Struktur - % in jeder Fraktion			
Elektrophoretische Mobilität	Ultra-Zentrifuge	Protein	Glycerid	Cholesterin	Phospholipide
Chylomikronen	2%	98%			
Beta	LDL*	21%	12%	45%	22%
Prä-Beta	VLDL*	10%	55%	13%	22%
Alpha	HDL*	50%	6%	18%	26%

* Keine standardisierten Abkürzungen: LDL (Low Density Lipoprotein), VLDL (Very Low Density Lipoprotein), HDL (High Density Lipoprotein).

Es ist unvermeidlich, dass es viele Ausnahmen zu den obigen Klassifikationen gibt. Eine davon ist das „Sinking Pre-Beta“. Dieses Prä-Beta Migrationsmaterial „sinkt“ in der Ultrazentrifuge zusammen mit der LDL- (Beta-Migration) -Fraktion⁵. Das ist das Lp(a) Lipoprotein von dem Dahien berichtet⁶. Man nimmt an, dass es sich um eine normale Variante handelt, die bei 10% der Bevölkerung gefunden wird. Eine weitere Ausnahme ist das „Floating Beta“. Dieses Beta-Migrationsmaterial „schwebt“ in der Ultrazentrifuge mit dem VLDL.

Dieses abnormale Lipoprotein erscheint in Hyperlipoproteinämien vom Typ III. Viele Arten von Trägermedien sind zur elektrophoretischen Trennung von Lipoproteinen verwendet worden. Als Fredrickson das Klassifizierungssystem ursprünglich entwickelte, benutzte er die Papierelektrophorese^{1,8}. In neuester Zeit sind Agarose-Gel, Stärkeblock und Polyacrylamid-Gel verwendet worden^{3,7}.

Das SAS-MX Lipoprotein Kit trennt die Serum-/Plasmalipoproteine in einem Agarose-Gel nach ihrer Ladung auf. Die Lipoproteine werden dann fixiert und zur Sichtbarmachung gefärbt.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle Reagenzien sind nur zur in-vitro-Diagnostik bestimmt. Nicht einnehmen oder mit dem Mund pipettieren. Beim Umgang mit den Kit-Komponenten ist das Tragen von Handschuhen erforderlich. Bitte lesen Sie das Sicherheitsdatenblatt mit den Gefahrenhinweisen und Sicherheitsvorschlägen sowie die Informationen zur Entsorgung.

INHALT

1. SAS-MX Lipoprotein-Gel

Enthält Agarose in einem Tris / Barbitallpuffer mit Natriumazid und Thiomersal als Konservierungsmittel. Das Gel ist gebrauchsfertig verpackt.

2. Tris-Barbital-Pufferkonzentrat

Enthält konzentrierten Tris-Barbital-Puffer mit Natriumazid als Konservierungsmittel. Den Inhalt der Flasche mit dest. Wasser auf 1 Liter verdünnen. Gut schütteln.

3. SAS-MX Lipoprotein-Farbstoff

Enthält Fettrot 7B Farbstoff. Inhalt des Fläschchens in 1 Liter Methanol auflösen, 24 Stunden rühren und vor Gebrauch filtrieren. Vorbereitung der Farbstoff-Gebrauchslösung: Unmittelbar vor Gebrauch 5ml dest. Wasser zu 25ml der Stammlösung geben. Das Wasser tropfenweise unter Rühren zugeben.

4. Weitere Kit-Komponenten

Jeder Kit enthält eine Methodenbeschreibung sowie die zur Durchführung der Elektrophorese notwendigen Auftragschablonen und Blotter A und Blotter C für 10 Gele.

LAGERUNG UND STABILITÄT

1. SAS-MX Lipoprotein-Gel

Gele sollten bei 15...30°C gelagert werden und sind bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. NICHT IM KÜHLSCHRANK ODER TIEFKÜHLSCHRANK AUFBEWAHREN! Der Zustand des Gels kann sich verschlechtern. Dafür gibt es folgende Merkmale: 1) Kristallisation weist auf vorangegangenes Einfrieren hin, 2) Risse und Ablösen weisen auf ein Austrocknen des Gels hin, und 3) sichtbare Kontamination der Agarose durch Bakterien oder Pilze.

2. Tris-Barbital-Puffer

Das Pufferkonzentrat sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Verdünnter Puffer ist bei 15...30°C für 2 Monate stabil.

3. SAS-MX Lipoprotein-Farbstoff

Der pulverisierte Farbstoff sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Aufgelöster Farbstoff ist bei 15...30°C für 6 Monate haltbar. In einer fest verschlossenen Flasche lagern.

SAS-MX LIPOPROTEIN

NICHT MITGELIEFERTES, ABER BENÖTIGTES MATERIAL

Kat. Nr. 4063 Kammer

Kat. Nr. 1525 EPS600 Netzteil

Trockenschrank mit Umluft und einer Temperaturleistung von 60...70°C.

Entfärbelösung: Unmittelbar vor Gebrauch 75ml Methanol mit 25ml dest. Wasser mischen.

Dest. Wasser

PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG

Frisches Serum oder EDTA-Plasma ist das Untersuchungsmaterial der Wahl. Proben können bei 2...6°C bis zu 5 Tagen gelagert werden. NICHT EINFRIEREN.

Patientenvorbereitung: Für eine möglichst genaue Phänotypisierung der Lipoproteinmuster sollten die folgenden Vorkehrungen vor Probenentnahme beachtet werden:

- 1) Der Patient sollte vor der Blutentnahme 12-14 Stunden nichts essen, um Interferenzen mit Mahlzeit bedingten Chylomikronen zu verhindern.
- 2) Falls möglich alle Medikamente 3-4 Wochen lang absetzen.
- 3) Der Patient sollte sein Gewicht halten und mindestens für 1 Woche ganz normal essen.
- 4) Nach einem Myokardinfarkt oder ähnlichen traumatischen Ereignis 4-8 Wochen warten.

Störfaktoren:

- 1) Heparintherapie kann die Wanderung der Lipoproteine, ganz besonders der Beta-Lipoproteine, verändern.
- 2) Aus den gleichen Gründen sollten Proben nicht in Heparin-Röhrchen abgenommen werden.

SCHRITT-FÜR-SCHRITT METHODE

1. Das Gel aus der Verpackung nehmen und auf ein Papiertuch legen. Die Geloberfläche mit einem Blotter C blotten und Blotter verwerfen.
2. Die Auftragschablone so auf das Gel legen, dass die Pfeile am Rand des Gels liegen. Blotter A auf die Schablone legen und mit einem Finger über die Schlitze der Schablone streichen, um eine gute Haftung zu gewährleisten. Blotter A entfernen und ihn bis zur Verwendung in Schritt 5 beiseite legen.
3. 2µl Probe in die jeweiligen Schablonenschlitze pipettieren. Probe für 7 Minuten ins Gel diffundieren lassen.
4. Während die Proben diffundieren, 25ml Puffer in jeden der inneren Bereiche der SAS-MX-Kammer füllen.
5. Nach Absorption der Probe den Blotter A aus Schritt 2 auf die Schablone drücken. Anschließend Schablone und Blotter entfernen.
6. Das Gel, Agaroseseite nach oben, in die Kammer spannen und auf übereinstimmende Polarisierung achten (Pluszeichen auf dem Gel und Pluszeichen in der Kammer).
7. Gel-Elektrophorese durchführen: 80 Volt, 45 Minuten.
8. Nach dem Elektrophoreselauf, das Gel bei 60...70°C trocknen.
9. Das trockene Gel in einen Färbetrog legen und vorsichtig 30ml frisch angesetzte Farbgebrauchslösung auf das Gel gießen. 2 Minuten färben.
10. Das Gel in zwei jeweils 15-30 Sekunden dauernden Waschvorgängen mit Entfärbelösung entfärben.
11. Gel kurz mit dest. Wasser abspülen und trocknen.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Es wird empfohlen, jegliche Auswertung der Gele im Vergleich zu Normalwerten durchzuführen, die in dem jeweiligen Labor für diese Methode ermittelt wurden.

1. **Qualitative Auswertung:** Das Gel optisch auf An- oder Abwesenheit von bestimmten interessanten Banden anschauen.
2. **Quantitative Auswertung:** Die Gele bei einer Wellenlänge von 525nm mit der Gelseite nach unten scannen.

Das Alpha-Lipoprotein (HDL) ist die Fraktion, die sich am schnellsten bewegt und am weitesten in Richtung Anode wandert.. Die Beta-Lipoprotein- (LDL) -Bande ist gewöhnlicherweise die Fraktion, die am stärksten hervortritt, und dabei sich nur wenig von der Auftragstelle entfernt. Prä-Beta-Lipoprotein (VLDL) wandert zwischen die Alpha- und Beta-Lipoproteine. Die Mobilität des Prä-Beta-Lipoproteins ist abhängig vom Grad der erzielten Auflösung, dem anwesenden Prä-Beta und der Menge der anwesenden Beta-Lipoproteine. Manchmal erscheint das Prä-Beta als Schliere vor den Beta-Lipoproteinen, manchmal kann es sich auch in 2 unabhängige Fraktionen aufteilen oder ganz fehlen. Die Unversehrtheit der Prä-Beta Fraktion nimmt mit zunehmendem Alter der Probe ab. Anwesende Chylomikronen verbleiben an der Auftragstelle.

Es ist nicht empfehlenswert, die Menge der einzelnen Lipid-Fraktion in mg/dl oder mmol/l zu berechnen (siehe EINSCHRÄNKUNGEN).

Ein normales Nüchternserum kann als ein klares Serum mit geringfügigen Mengen an Chylomikronen und normalen Cholesterin- und Triglyceridwerten definiert werden. Bei der Elektrophorese erscheint das Beta-Lipoprotein als Hauptfraktion mit einem schwachen oder fehlenden Prä-Beta-Lipoprotein und einer eindeutigen Alpha-Lipoprotein-Bande, die aber weniger intensiv ist als Beta.

Ein Patient muss für eine Hyperlipoproteinämie ein erhöhtes Cholesterin oder erhöhte Triglyzeride haben. Dieser erhöhte Wert muss als primär oder sekundär zu Stoffwechselstörungen wie Hypothyreoidismus, Verschlussikterus, nephrotisches Syndrom, Dysproteinämien oder schlecht eingestellten insulinpflichtigen Diabetes Mellitus bestimmt sein.

Primäre Lipidämie entsteht aufgrund genetisch bedingten Faktoren oder Umweltfaktoren mit unbekanntem Wirkungsweisen wie z. B. Ernährungsgewohnheiten, Alkoholaufnahme und Medikamente, besonders Östrogene oder Steroidhormone¹². Als primär werden auch solche Lipoproteinämien angesehen, die mit Ketose resistentem Diabetes, Pankreatitis und Fettleibigkeit in Verbindung stehen. Diabetes Mellitus und Pankreatitis können schwierig sein insofern, dass es oft nicht leicht ist festzustellen, ob die Hyperlipoproteinämie oder die Erkrankung der auslösende Faktor ist.

Für einen vollständigen Überblick zur Phänotypisierung von Lipoprotein mit einer Beschreibung der Kriterien siehe Fredrickson, D.S. und Lees, R.S¹.

Ein merklicher Anstieg in Alpha-Lipoproteinen können beim Verschlussikterus und der Leberzirrhose beobachtet werden. Eine deutliche Reduzierung wird bei dem parenchymatösen Ikterus festgestellt. Tangier-Krankheit ist eine seltene genetische Störung, die durch das völlige Fehlen von normalen Alpha-Lipoproteinen charakterisiert ist. Heterozygote zeigen verminderte Level an Alpha-Lipoproteinen⁸. Es ist zu beachten, dass Hyperöstrogenämie (Schwangerschaft und orale Einnahme von Empfängnisverhütungsmitteln) eine mäßige Erhöhung der Alpha-Lipoproteine verursachen kann¹².

SAS-MX LIPOPROTEIN

Abetalipoproteinämie ist ein primär vererbter Defekt, der durch schwere Defekte in allen Lipoproteinen mit einer Dichte von unter 1.063 charakterisiert ist (mit Ausnahme der Alpha-Lipoproteine). Sie wird von zahlreichen klinischen Symptomen begleitet; die Lebenserwartung ist gering. Es ist von einigen wenigen familiär vorkommenden Hypobetalipoproteinämien berichtet worden. Es gibt einige Hinweise darauf, dass sich die Mutation von der unterscheidet, die die Abetalipoproteinämie hervorruft⁹.

Lipoprotein-X ist ein abnormales Lipoprotein, das oft bei Patienten mit Verschlussikterus zu finden ist. Es besteht aus nicht verestertem (freien) Cholesterin, Phospholipiden und VLDL-Protein. Lipoprotein-X wandert langsamer als LDL. Wegen seines besonderen Lipidgehalts färbt es sich nur schlecht oder gar nicht mit den üblichen Fettfarbstoffen an und wird deswegen gewöhnlicherweise in einer Standard-Lipoprotein-Elektrophorese nicht nachgewiesen. Lipoprotein-X ist deutlich sichtbar, wenn Cholesterin spezifische enzymatische Färbemethoden angewandt werden.

QUALITÄTSKONTROLLE

Lipotrol-Kontrolle (Kat. Nr. 5069) überprüft alle Phasen der Methode und sollte bei jedem Lauf mitgeführt werden. Siehe Packungsbeilage der Kontrolle für zulässige Testergebnisse.

EINSCHRÄNKUNGEN

Fettrot 7B und Sudan Fettfarbstoffe haben eine viel größere Affinität zu Triglyzeriden und Cholesterinester als zu freiem Cholesterin und Phospholipiden. Banden, die nach der Färbung mit diesen Farbstoffen sichtbar werden, spiegeln nicht die genaue Quantifizierung der Gesamt-Plasmalipide wider¹⁰.

Da die Lipidstruktur jeder einzelnen Lipoproteinfraktion veränderlich ist, ist es unbedingt erforderlich, bevor ein Bandenmuster klassifiziert werden kann, die Gesamtcholesterin und -triglyzeridwerte zu bestimmen^{8,9}. In Bezug auf Diagnose oder Ausschluss einer Typ-III-Hyperlipoproteinämie ist eine genauere Quantifizierung der Lipoproteine wie Ultrazentrifugation⁴ oder PAGE-Elektrophorese¹¹ absolut erforderlich.

REFERENZWERTE

Es wird empfohlen, die Auswertung der Gele gegen Normalwerte vorzunehmen, die für diesen Test in jedem einzelnen Labor ermittelt worden sind.

Eine Normalbereichstudie mit Proben von 48 offensichtlich gesunden männlichen und weiblichen Probanden wurde durchgeführt.

Fraktion	Bereich
Alpha-Lipoproteine	14 - 46%
Prä-Beta-Lipoproteine	6 - 40%
Beta-Lipoproteine	28 - 61.7%
Chylomikronen	0 - 2%

LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

Präzision innerhalb eines Laufs: 8 Wiederholungen derselben Probe auf demselben Gel.

Fraktion	Mittelwert (%)	CV (%)
Alpha-Lipoprotein	26,3	5,2
Prä-Beta-Lipoprotein	29,4	4,0
Beta-Lipoprotein	44,4	4,3

Präzision zwischen den Läufen: Eine einzige Probe wurde auf 10 verschiedenen Gelen aufgetrennt.

Fraktion	Mittelwert (%)	CV (%)
Alpha-Lipoprotein	25,2	9,0
Prä-Beta-Lipoprotein	34,7	4,2
Beta-Lipoprotein	44,0	2,7

LITERATUR

1. Fredrickson, D.S and Lees, R.S. 'A System For Phenotyping Hyperlipoproteinemias', Circulation, 1965; 31(3) : 321-327.
2. Henry, R.J. Ed., 'Clinical Diagnosis and Management of Laboratory Methods', 17th Ed., W.B. Saunders & Co., New York, 194-201, 1984.
3. Lewis, L.A. and Oppet, J.J. Ed., 'CRC Handbook of Electrophoresis Vol II Lipoproteins in Disease', CRC Press Inc., Florida, 63-239, 1980.
4. Levy, R.I. and Fredrickson, D.S. 'Diagnosis and Management of Hyperlipoproteinemia', Am. J. Cardiol., 1968; 22(4) : 576-583.
5. Houstmuller, A.J., 'Agarose-gel Electrophoresis of Lipoproteins: A Clinical Screening Test', Koninklijke Van Gorcum and Comp., The Netherlands, p5, 1969.
6. Stonde, N.J. and Levy, R.I. 'The Hyperlipidemias and Coronary Artery Disease', Disease-A-Month, 1972.
7. Dahlen, G. 'The Pre-Beta Lipoprotein Phenomenon in Relation to Serum Cholesterol and Triglyceride Levels: The Lp(a) Lipoprotein and Coronary Heart Disease', Umea University Medical Dissertations, Sweden, No. 20, 1974.
8. Fredrickson, D.S., Levy, R.I. and Lees, R.S., 'Fat Transport in Lipoproteins - An Integrated Approach To Mechanisms and Disorders' N. Eng. J. Med., 1967; 276 : 34-42, 94-103, 148-156, 215-226, 273-281.
9. Fredrickson, D.S. 'When To Worry About Hyperlipidemia', Consultant, December 1974.
10. Davidsohn, I. And Henry, J.B., Todd-Sanford: 'Clinical Diagnosis by Laboratory Methods', 15th ed., p 639, 1974.
11. Masket, B.H., Levy, R.I and Fredrickson, D.S., 'The Use Of Polyacrylamide Gel Electrophoresis in Differentiating Type III Hyperlipoproteinemia', J. Lab. Clin. Med., 1973 ; 81 (5) : 794-802.
12. World Health Organisation Memorandum: Classification of Hyperlipidemias and Hyperlipoproteinemias', Circulation, 1972; 45 : 501-508.

SAS-MX LIPOPROTEINE**PRINCIPIO**

Il kit SAS-MX Lipoproteine viene utilizzato per la separazione e quantificazione delle lipoproteine nel siero o nel plasma mediante elettroforesi su gel di agarosio.

Da quando nel 1965 Fredrickson e Lees proposero un sistema per fenotipizzare l'iperlipoproteinemia¹, il concetto di individuazione e prevenzione della coronaropatia utilizzando l'elettroforesi lipoproteica è diventato un test relativamente comune.

Gli studi epidemiologici hanno messo in correlazione l'assunzione alimentare di grassi, in particolare modo di colesterolo, e i livelli ematici dei lipidi con l'incidenza dell'aterosclerosi, le cui principali manifestazioni sono le malattie cardiovascolari e l'ictus. Anche il cuore ischemico è stato correlato all'ipercolesterolemia². La necessità di determinare con precisione i fenotipi delle lipoproteine ha portato a riconoscere che l'iperlipoproteinemia è sintomatica di un gruppo di malattie dissimili per caratteristiche cliniche, prognosi e reattività al trattamento. Poiché i trattamenti delle malattie variano con i diversi fenotipi, è assolutamente necessario che venga stabilito l'esatto fenotipo prima dell'inizio della terapia³. Nel sistema di classificazione proposto da Fredrickson e Lees, soltanto i tipi II, III e IV presentano una relazione comprovata con l'aterosclerosi. I lipidi plasmatici non circolano liberamente nel plasma, ma vengono trasportati legati alle proteine e pertanto possono essere classificati come lipoproteine. Le varie frazioni sono formate da diverse combinazioni di proteine, colesterolo, gliceridi, esteri di colesterolo, fosfatidi e acidi grassi liberi⁴. Per separare le lipoproteine plasmatiche sono state utilizzate numerose tecniche, tra cui l'ultracentrifugazione, la cromatografia a strato sottile, le tecniche immunologiche e l'elettroforesi. L'elettroforesi e l'ultracentrifugazione rappresentano due dei metodi più ampiamente utilizzati e per ciascuno di essi è nata una terminologia specifica. Nella tabella 1 viene presentata la correlazione tra queste classificazioni e la composizione relativa di ciascuna frazione in termini di lipidi e proteine.

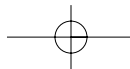
Classificazione in base a:		Composizione - % in ciascuna frazione			
Mobilità elettroforetica	Ultracentrifuga	Proteina	Gliceride	Colesterolo	Fosfolipidi
Chilomicroni		2%	98%		
Beta	LDL*	21%	12%	45%	22%
Pre-Beta	VLDL*	10%	55%	13%	22%
Alfa	HDL*	50%	6%	18%	26%

* Abbreviazioni non standard: LDL (lipoproteina a bassa densità), VLDL (lipoproteina a bassissima densità), HDL (lipoproteina ad alta densità).

Esistono inevitabilmente varie eccezioni alle suddette classificazioni. Una di queste è la cosiddetta "sinking pre-beta", costituita da materiale pre-beta migrante che "affonda" nell'ultracentrifuga assieme alla frazione LDL (beta migrante)⁵. Si tratta della lipoproteina Lp(a) segnalata da Dahien⁷, che viene considerata una normale variante riscontrata nel 10% della popolazione.

Un'altra eccezione è la cosiddetta "floating beta", costituita da materiali beta migranti che "galleggiano" nell'ultracentrifuga con la VLDL.

Questa lipoproteina anomala compare nelle iperlipoproteinemie di tipo III. Per la separazione elettroforetica delle lipoproteine sono stati utilizzati vari tipi di mezzi di supporto. Quando Fredrickson ideò inizialmente il sistema di classificazione, egli utilizzò l'elettroforesi su carta¹⁸. Più di recente sono stati utilizzati il gel di agarosio, il blocchetto di amido e il gel di poliacrilamide¹⁹.



Il kit SAS-MX Lipoproteine separa le lipoproteine seriche / plasmatiche secondo la loro carica elettrica in un gel di agarosio. Le lipoproteine vengono quindi fissate e colorate per la visualizzazione.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Tutti i reagenti devono essere utilizzati esclusivamente per diagnosi in vitro. Non ingerire né pipettare con la bocca i componenti del kit. Indossare guanti protettivi durante l'uso dei componenti del kit. Per le indicazioni relative ai rischi e alla sicurezza e le informazioni sullo smaltimento, fare riferimento alle schede tecniche dei prodotti.

COMPOSIZIONE

1. SAS-MX Gel per lipoproteine

Contiene agarosio in un tampone tris / barbital con sodio azide e tiomersale come conservanti. Il gel è pronto all'uso nella confezione fornita.

2. Tampone Concentrato Tris / Barbital

Contiene un tampone concentrato tris / barbital con sodio azide come conservante. Diluire l'intero contenuto del flacone con 1 litro di acqua distillata e miscelare bene.

3. SAS-MX Colorante per lipoproteine

Contiene colorante Fat Red 7B. Sciogliere il contenuto della fiala in 1 litro di metanolo, agitare per 24 ore e filtrare prima dell'uso. Preparazione del colorante di lavoro: Immediatamente prima dell'uso, aggiungere 5ml di acqua distillata a 25ml di colorante a magazzino. Aggiungere l'acqua a gocce, agitando contemporaneamente.

4. Altri componenti del kit

Ogni kit contiene inoltre un foglio procedurale, blotter A e C, mascherine per l'applicazione del campione, in quantità sufficiente per completare 10 gel.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

1. SAS-MX Gel per lipoproteine

I gel devono essere conservati a 15...30°C e sono stabili fino alla data di scadenza riportata sulla confezione. NON REFRIGERARE NÉ CONGELARE. Il deterioramento del gel può essere indicato da 1) formazioni cristalline per effetto di congelamento, 2) screpolature e fessurazione per effetto di essiccamento oppure, 3) contaminazione visibile dell'agarosio causata da batteri o funghi.

2. Tampone tris-barbital

Il tampone concentrato deve essere conservato a 15...30°C, è stabile fino a data di scadenza riportata sull'etichetta del flacone. Il tampone diluito è stabile per 2 mesi a 15...30°C.

3. SAS-MX Colorante per lipoproteine

Il colorante concentrato deve essere conservato a 15...30°C ed è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta del flacone. Il colorante disciolto è stabile per 6 mesi a 15...30°C. Conservare in una bottiglia tappata ermeticamente.

MATERIALI NECESSARI, MA NON IN DOTAZIONE

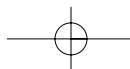
Cod. N. 4063 Camera

Cod. 1525 Alimentatore EPS600

Forno di essiccazione ad aria forzata con temperature di 60...70°C

Soluzione decolorante: mescolare 75ml di metanolo e 25ml di acqua distillata immediatamente prima dell'uso.

Acqua distillata



SAS-MX LIPOPROTEINE

RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE

Il campione ideale è costituito da siero fresco o plasma trattato con EDTA. I campioni possono essere refrigerati a 2...6°C fino a 5 giorni. NON CONGELARE.

Preparazione del paziente: Per garantire la fenotipizzazione più accurata dei pattern lipoproteici, è necessario adottare le seguenti misure precauzionali prima del prelievo:

- 1) Il paziente deve digiunare per un periodo di 12-14 ore prima del prelievo, per evitare interferenze con i chilomicroni indotti dal cibo.
- 2) Se possibile, sospendere tutti i farmaci per 3-4 settimane.
- 3) Sarebbe opportuno che il paziente mantenesse un peso stabile e seguisse una dieta normale per almeno 1 settimana.
- 4) In caso di infarto miocardico o episodio traumatico simile, attendere 4-8 settimane.

Fattori d'interferenza:

- 1) La terapia eparinica può causare alterazioni nella migrazione delle lipoproteine, specialmente nel caso della lipoproteina beta.
- 2) Per ragioni analoghe i campioni non devono essere raccolti in anticoagulante eparinico.

PROCEDURA

1. Rimuovere il gel dalla confezione e collocarlo su una bibula. Asciugare la superficie del gel con un blotter C e poi eliminarlo.
2. Allineare la mascherina per l'applicazione del campione rispetto alle frecce presenti sul bordo del gel. Porre un blotter A sopra alla mascherina ed effettuare una leggera pressione con le dita sulle fessure per verificare il corretto contatto. Rimuovere il blotter e conservarlo per il passaggio 5.
3. Applicare 2µl di campione in ogni fessura di semina e lasciare assorbire per 7 minuti.
4. Durante l'assorbimento del campione, collocare 25ml di tampone in ogni compartimento interno della camera SAS-MX.
5. Dopo l'assorbimento del campione, asciugare leggermente la mascherina con il blotter A, conservato dal passaggio 2, quindi eliminare mascherina e blotter.
6. Collocare il gel all'interno della camera, con il lato dell'agarosio rivolto verso l'alto, allineando i lati positivo (+) e negativo (-) con le posizioni corrispondenti sulla camera.
7. Sottoporre il gel ad elettroforesi: 80 Volt per 45 minuti.
8. Al termine dell'elettroforesi, asciugare il gel a 60...70°C.
9. Collocare il gel asciutto in un piatto di colorazione e versare con cautela su di esso i 30ml di colorante di lavoro appena preparato. Eseguire la colorazione per 2 minuti.
10. Decolorare il gel in 2 lavaggi di 15-30 secondi nella soluzione decolorante.
11. Sciacquare velocemente il gel con acqua distillata e asciugare.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Si consiglia ad ogni singolo laboratorio di creare, con questo metodo, il proprio range di normalità.

- 1. Valutazione qualitativa:** Ispezionare i gel visivamente per accertare la presenza o assenza di bande di particolare interesse.
- 2. Valutazione quantitativa:** Analizzare i gel (con il lato del gel rivolto verso il basso) a 525nm.

L'alfa-lipoproteina (HDL) è la frazione in più rapido movimento e migra alla distanza maggiore verso l'anodo. La banda della beta-lipoproteina (LDL) è solitamente la frazione più evidente, che migra più vicino al punto di applicazione. La pre-beta lipoproteina (VLDL) migra tra le alfa e beta-lipoproteine. La mobilità della pre-beta lipoproteina varia con il grado di risoluzione ottenuto, il tipo di pre-beta presente e la quantità di beta-lipoproteine presenti. Talvolta, la pre-beta appare come uno striscio esattamente di fronte alle beta-lipoproteine, mentre altre volte può suddividersi in 2 frazioni separate o può essere completamente assente. L'integrità della frazione pre-beta si riduce con l'età del campione. I chilomicroni, se presenti, rimangono nel punto di applicazione.

Si sconsiglia di calcolare la quantità di ciascuna frazione lipidica come mg/dL o mmol/L (ved. LIMITAZIONI).

Un normale siero a digiuno può essere definito come un siero chiaro con chilomicroni trascurabili e livelli normali di colesterolo e trigliceridi. In elettroforesi, la beta-lipoproteina appare come la frazione principale con una pre-beta lipoproteina debole o assente, mentre la banda dell'alfa-lipoproteina è ben definita ma meno intensa rispetto alla beta.

Per presentare un'iperlipoproteinemia, un paziente deve possedere un elevato livello di colesterolo o trigliceridi. L'innalzamento deve essere determinato come primario o secondario a disturbi metabolici come ipotiroidismo, ittero ostruttivo, sindrome nefrosica, disproteinemie o diabete mellito insulinopenico scarsamente controllato.

La lipidemia primaria emerge da fattori geneticamente determinati o fattori ambientali dal meccanismo sconosciuto, come dieta, assunzione di alcol e sostanze quali, in particolar modo, estrogeno o ormoni steroidei¹². Vengono considerate primarie anche le lipoproteinemie associate a diabete resistente a chetosi, pancreatite ed obesità. Il diabete mellito e la pancreatite possono essere fuorvianti, in quanto è spesso difficile stabilire se il fattore determinante è l'iperlipoproteinemia o la malattia stessa.

Per un'analisi completa della fenotipizzazione delle lipoproteine, con le descrizioni dei criteri, ved. Fredrickson, D.S. e Lees, R.S.¹⁸.

Incrementi marcati delle alfa-lipoproteine si osservano nella malattia epatica ostruttiva e nella cirrosi. Notevoli riduzioni si osservano invece nella malattia epatica parenchimale. La malattia di Tangier è una rara patologia genetica caratterizzata dalla totale assenza di alfa-lipoproteine normali. Gli eterozigoti mostrano livelli ridotti di alfa-lipoproteine⁸. È opportuno osservare che l'iperestrogenemia (gravidanza e uso di contraccettivi orali) può causare moderati aumenti delle alfa-lipoproteine.

SAS-MX LIPOPROTEINE

L'abetalipoproteinemia è un deficit ereditario primario caratterizzato da una grave carenza di tutte le lipoproteine con densità inferiore a 1,063 (tutte eccetto le alfa-lipoproteine). Questo deficit è accompagnato da numerosi sintomi clinici e presenta un'aspettativa di vita limitata. Sono stati riferiti alcuni casi di ipobetalipoproteinemia familiare. Secondo prove esistenti, la mutazione sarebbe diversa da quella che genera l'abetalipoproteinemia⁴.

La lipoproteina X è una lipoproteina anomala spesso osservata in pazienti affetti da malattia epatica ostruttiva. Questa lipoproteina è costituita da colesterolo non esterificato (libero), fosfolipidi e proteina VLDL e migra più lentamente dell'LDL. In ragione del suo particolare contenuto lipidico, questa lipoproteina si colora scarsamente o non si colora affatto con i coloranti lipidici abituali e pertanto non viene generalmente rilevata dall'elettroforesi lipoproteica standard. La lipoproteina X è chiaramente visibile quando si utilizzano metodi di colorazione enzimatica specifici per il colesterolo.

CONTROLLO QUALITÀ

Il controllo Lipotrol (Cod. N. 5069) può essere utilizzato per verificare tutte le fasi della procedura e deve essere impiegato su ogni piastra. Fare riferimento alle schede all'interno della confezione per i valori di dosaggio accettabili.

LIMITAZIONI

Il Fat Red 7B, così come i coloranti per grassi Sudan, presenta un'affinità molto maggiore con i trigliceridi e gli esteri di colesterolo rispetto a quella mostrata con il colesterolo libero e i fosfolipidi. Le bande osservate in seguito alla colorazione con queste sostanze non rispecchiano una vera e propria quantificazione dei lipidi plasmatici totali¹⁰.

Poiché la composizione lipidica di ciascuna frazione lipoproteica è variabile, è di fondamentale importanza determinare i livelli totali di colesterolo e trigliceridi prima di tentare di classificare un pattern^{8,9}. Quando si tratta di diagnosticare o di escludere un'iperlipoproteinemia di tipo III, è fondamentale compiere una quantificazione maggiormente definitiva delle lipoproteine, avvalendosi dell'ultracentrifugazione⁴ o dell'elettroforesi PAGE I I.

VALORI DI RIFERIMENTO

Si raccomanda di effettuare qualsiasi valutazione dei gel sulla base dei valori normali prodotti per questo esame in ogni singolo laboratorio.

Uno studio dei range normali è stato eseguito utilizzando campioni prelevati da 48 volontari apparentemente sani di sesso maschile e femminile:

Frazione	Range
Alfa-lipoproteine	14 - 46%
Pre-beta lipoproteine	6 - 40%
Beta-lipoproteine	28 - 61,7%
Chilomicroni	0 - 2%

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Precisione entro la serie: 8 repliche dello stesso campione su un singolo gel.

Frazione	Media (%)	CV (%)
Alfa-lipoproteina	26,3	5,2
Pre-beta lipoproteina	29,4	4,0
Beta-lipoproteina	44,4	4,3

Precisione tra la serie: Un singolo campione su 10 gel diversi.

Frazione	Media (%)	CV (%)
Alfa-lipoproteina	25,2	9,0
Pre-beta lipoproteina	34,7	4,2
Beta-lipoproteina	44,0	2,7

BIBLIOGRAFIA

1. Fredrickson, D.S and Lees, R.S. 'A System For Phenotyping Hyperlipoproteinemias', Circulation, 1965; 31(3) : 321-327.
2. Henry, R.J. Ed., 'Clinical Diagnosis and Management of Laboratory Methods', 17th Ed., W.B. Saunders & Co., New York, 194-201, 1984.
3. Lewis, L.A. and Oppet, J.J. Ed., 'CRC Handbook of Electrophoresis Vol II Lipoproteins in Disease', CRC Press Inc., Florida, 63-239, 1980.
4. Levy, R.I. and Fredrickson, D.S. 'Diagnosis and Management of Hyperlipoproteinemia', Am. J. Cardiol., 1968; 22(4) : 576-583.
5. Houstmuller, A.J., 'Agarose-gel Electrophoresis of Lipoproteins: A Clinical Screening Test', Koninklijke Van Gorcum and Comp., The Netherlands, p5, 1969.
6. Stonde, N.J. and Levy, R.I. 'The Hyperlipidemias and Coronary Artery Disease', Disease-A-Month, 1972.
7. Dahlen, G. 'The Pre-Beta Lipoprotein Phenomenon in Relation to Serum Cholesterol and Triglyceride Levels: The Lp(a) Lipoprotein and Coronary Heart Disease', Umea University Medical Dissertations, Sweden, No. 20, 1974.
8. Fredrickson, D.S., Levy, R.I. and Lees, R.S., 'Fat Transport in Lipoproteins - An Integrated Approach To Mechanisms and Disorders' N. Eng. J. Med., 1967; 276 : 34-42, 94-103, 148-156, 215-226, 273-281.
9. Fredrickson, D.S. 'When To Worry About Hyperlipidemia', Consultant, December 1974.
10. Davidsohn, I. And Henry, J.B., Todd-Sanford: 'Clinical Diagnosis by Laboratory Methods', 15th ed., p 639, 1974.
11. Masket, B.H., Levy, R.I and Fredrickson, D.S., 'The Use Of Polyacrylamide Gel Electrophoresis in Differentiating Type III Hyperlipoproteinemia', J. Lab. Clin. Med., 1973; 81(5) : 794-802.
12. World Health Organisation Memorandum: Classification of Hyperlipidemias and Hyperlipoproteinemias', Circulation, 1972; 45 : 501-508.

LIPOPROTEÍNAS SAS-MX**USO PREVISTO**

El objetivo del kit de lipoproteínas SAS-MX es la separación y cuantificación de lipoproteínas en el suero o el plasma por electroforesis con gel de agarosa.

Desde que Fredrickson y Lees propusieron un sistema para fenotipificar la hiperlipoproteinemia en 1965¹, el concepto de la detección y prevención de la cardiopatía coronaria usando electroforesis de las lipoproteínas se ha convertido en una prueba relativamente frecuente.

Algunos estudios epidemiológicos han relacionado la ingesta dietética de grasas, especialmente el colesterol y los niveles sanguíneos de los lípidos con las incidencias de aterosclerosis, algunas de cuyas manifestaciones importantes son la enfermedad cardiovascular y el ictus. También se ha relacionado la cardiopatía isquémica con la hipercolesterolemia^{2,3}. La necesidad de determinación exacta de los fenotipos de las lipoproteínas procedió del reconocimiento de que la hiperlipoproteinemia es sintomática de un grupo de trastornos distintos en características clínicas, pronóstico y sensibilidad al tratamiento. Como los tratamientos de los trastornos varían con los diferentes fenotipos, es absolutamente necesario que el fenotipo correcto se establezca antes de comenzar el tratamiento⁴. En el sistema de clasificación propuesto por Fredrickson y Lees, sólo los tipos II, III y IV tienen una relación demostrada con la aterosclerosis. Los lípidos plasmáticos no circulan libremente en el plasma, sino que son transportados unidos a proteínas y, pueden clasificarse así como lipoproteínas. Las diversas fracciones están compuestas de combinaciones diferentes de proteínas, colesterol, glicéridos, ésteres del colesterol, fosfáticas y ácidos grasos libres⁵. Se han empleado varias técnicas para separar las lipoproteínas plasmáticas, incluida la ultra centrifugación, la cromatografía en capa fina, las técnicas inmunológicas y la electroforesis. La electroforesis y la ultra centrifugación son dos de los métodos más usados y cada uno da lugar a su propia terminología. La tabla I muestra la correlación de estas clasificaciones y la composición relativa de lípidos y proteínas de cada fracción.

Clasificación según:		Composición - % en cada fracción			
Electroforética Movilidad	Ultra-centrifugación	Proteínas	Glicéridos	Colesterol	Fosfolípidos
Chylomicrons		2%	98%		
Beta	LDL*	21%	12%	45%	22%
pre-Beta	VLDL*	10%	55%	13%	22%
Alpha	HDL*	50%	6%	18%	26%

* Abreviaturas no estándar: LDL (lipoproteína de baja densidad), VLDL (lipoproteína de muy baja densidad), HDL (lipoproteína de alta densidad).

Inevitablemente, existen diversas excepciones a las clasificaciones anteriores. Una de estas es la "pre-beta que se hunde", que es material de migración pre-beta que "se hunde" en la ultra centrifuga junto con la fracción LDL (migración beta)⁶. Esta es la lipoproteína Lp(a) comunicada por Dahien⁷. Se considera una variante normal que se encuentra en el 10% de la población.

Otra excepción es la "beta flotante", que son materiales con migración beta que "flotan" en la ultra centrifuga con la VLDL.

Esta lipoproteína anormal aparece en las hiperlipoproteinemias de tipo III. Se han usado varios tipos de medios de soporte para la separación electroforética de las lipoproteínas. Cuando Fredrickson describió originalmente el sistema de clasificación, utilizó electroforesis en papel⁸. Más recientemente, se han usado gel de agarosa, bloques de almidón y gel de poliacrilamida^{5,7}.

El kit lipoproteína SAS-MX separa las lipoproteínas del suero / plasma según su carga en gel de agarosa. Luego se fijan y tiñen las lipoproteínas para su visualización.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Todos los reactivos son exclusivamente para uso diagnóstico in-vitro. No ingerir ni chupar con la boca ningún componente del kit. Usar guantes para manejar todos los componentes del kit. Consultar la hoja con los datos de seguridad del producto acerca de los riesgos de los componentes, avisos de seguridad y consejos para su eliminación.

COMPOSICIÓN

1. Gel de lipoproteínas SAS-MX

Contiene agarosa en un tampón de Tris / Barbitol, con azida de sodio y tiomersal como conservantes. El gel viene envasado listo para usar.

2. Concentrado tampón de Tris / Barbitol.

Contiene concentrado tampón de Tris-barbitol con azida de sodio como conservante. Diluir el contenido del frasco en 1 litro de agua destilada y mezclar bien.

3. Colorante de lipoproteínas SAS-MX

Contiene colorante rojo graso 7B. Disolver el contenido del vial en 1 litro de metanol, agitar durante 24 horas y filtrar antes de su uso. Preparación del colorante de trabajo: Inmediatamente antes de su uso, añadir 5ml de agua destilada a 25ml del colorante de reserva. Añadir el agua gota a gota con agitación.

4. Otros componentes del kit

Cada kit contiene una hoja de instrucciones y suficientes plantillas de aplicación de la muestra y secantes A y C, hasta completar 10 geles.

ALMACENAMIENTO Y PERÍODO DE VALIDEZ

1. Gel de lipoproteínas SAS-MX

Los geles han de almacenarse a una temperatura entre 15...30°C y permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en el envase. NO REFRIGERAR NI CONGELAR. El deterioro del gel puede ser indicado por: 1) apariencia cristalina, indicativo de que el gel ha sido congelado, 2) agrietamiento y descamación, indicativo del resecamiento del gel, o 3) contaminación visible de la agarosa por fuentes bacterianas o micóticas.

2. Concentrado tampón de Tris / Barbitol.

El concentrado tampón debe almacenarse a una temperatura entre 15...30°C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en el envase. El tampón diluido permanece estable durante 2 meses a una temperatura entre 15...30°C.

3. Colorante de lipoproteínas SAS-MX

El colorante en polvo debe almacenarse a una temperatura entre 15...30°C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. El colorante disuelto permanece estable durante 6 meses a temperatura de 15...30°C. Almacenar en un frasco herméticamente cerrado.

LIPOPROTEÍNAS SAS-MX

ARTÍCULOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

Nº de catálogo 4063 Cámara

Nº de catálogo 1525 Fuente de alimentación EPS600

Horno de secado con ventilación forzada con capacidad de 60...70°C

Solución decolorante: mezclar 75ml de metanol y 25ml de agua destilada inmediatamente antes de su uso.

Agua destilada.

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Se elegirá como muestra suero recién recogido o plasma anticoagulado con EDTA. Las muestras se pueden guardar a una temperatura entre 2...6°C hasta 5 días. NO CONGELAR.

Preparación del paciente: Para la fenotipificación más exacta de los modelos de lipoproteínas, deben observarse las siguientes precauciones antes de la toma de la muestra:

- 1) El paciente debe ayunar durante un período de 12-14 horas antes de la toma de las muestras para impedir la interferencia por los quilos micrones inducidos por la comida.
- 2) Suspender todos los medicamentos durante 3-4 semanas si es posible.
- 3) El paciente debería mantener un peso estable y llevar una dieta normal durante al menos 1 semana.
- 4) Si ha padecido un infarto de miocardio o un episodio similar, esperar de 4 a 8 semanas.

Factores de interferencia:

- 1) Los tratamientos con heparina pueden resultar en alteraciones en la migración de las lipoproteínas, particularmente en el caso de las lipoproteínas beta.
- 2) No deben recogerse muestras en el anticoagulante heparina por razones similares.

PROCEDIMIENTO PASO A PASO

1. Sacar el gel del envase y colocarlo sobre una toallita de papel. Secar la superficie del gel con un secante C y luego desechar el secante.
2. Alinear la plantilla de aplicación de la muestra con las flechas existentes en el borde del gel. Aplicar un secante A sobre la parte superior de la plantilla y frotar con un dedo a lo largo de las rejillas para asegurar un buen contacto. Retirar el secante y conservarlo para utilizarlo luego en el paso 5.
3. Aplicar 2µl de muestra en cada ranura y dejar que absorba durante 7 minutos.
4. Mientras la muestra es absorbida, verter aproximadamente 25ml del concentrado tampón en cada hueco interior de la cámara SAS-MX.
5. Finalizada la absorción de la muestra, secar la plantilla con el secante A que se ha conservado del paso 2, retirar el secante y la plantilla.
6. Colocar el gel en la cámara con la agarosa hacia arriba, alineando los lados positivo (+) y negativo (-) con las posiciones correspondientes en la cámara.
7. Realizar la electroforesis del gel: 80 voltios, 45 minutos
8. Finalizada la electroforesis, secar el gel a 60...70°C.
9. Colocar el gel seco en un plato de coloración y verter cuidadosamente los 30ml del colorante de trabajo recién preparado en el gel. Teñir durante 2 minutos.
10. Decolorar el gel en 2 lavados de 15-30 segundos en solución decolorante.
11. Lavar el gel brevemente en agua destilada y secar.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Es aconsejable realizar cualquier evaluación de los geles contrastándola con valores normales obtenidos por este método en cada laboratorio en particular.

- 1. Evaluación cualitativa:** Inspeccionar visualmente el gel para detectar la presencia o ausencia de bandas específicas de interés.
- 2. Evaluación cuantitativa:** Escanear los geles, con el gel hacia abajo, a 525nm.

La alfa-lipoproteínas (HDL) es la fracción de movimiento más rápido y es la que más migra hacia el ánodo. La banda de beta-lipoproteína (LDL) suele ser la fracción más prominente y es la que migra más próxima al punto de aplicación. La pre-beta lipoproteína (VLDL) migra entre las lipoproteínas alfa y beta. La movilidad de la lipoproteína pre-beta varía con el grado de resolución obtenido, el tipo de pre-beta presente y la cantidad de beta-lipoproteínas presentes. A veces, la pre-beta aparecerá como una extensión justo en frente de las beta-lipoproteínas, otras veces se puede dividir en 2 fracciones separadas o puede estar totalmente ausente. La integridad de la fracción pre-beta disminuye con la edad de la muestra. Los quilomicrones, cuando están presentes, permanecen en el punto de aplicación.

No se recomienda calcular la cantidad de cada fracción de lípidos como mg/dl o mmol/l (véase LIMITACIONES).

Puede definirse un suero normal en ayunas como un suero limpio con quilomicrones despreciables y niveles normales de colesterol y triglicéridos. En la electroforesis, la beta-lipoproteína aparece como la fracción principal, con la lipoproteína pre-beta tenue o ausente y la banda de alfa-lipoproteínas clara pero menos intensa que la beta.

Un paciente debe tener colesterol o triglicéridos elevados para tener hiperlipoproteinemia. La elevación debe determinarse como primaria o secundaria a trastornos metabólicos como el hipotiroidismo, la ictericia obstructiva, el síndrome nefrótico, las disproteinemias o una diabetes mellitus insulino péptica mal controlada.

La lipemia primaria surge por factores determinados genéticamente o factores ambientales de mecanismo desconocido como la dieta, la ingesta de alcohol y los fármacos, especialmente los estrógenos y las hormonas esteroideas¹². También se consideran primarias las lipoproteinemias asociadas a la diabetes resistente a la cetosis, la pancreatitis y la obesidad. La diabetes mellitus y pancreatitis pueden ser factores de confusión, porque a menudo es difícil decir si el factor causal es la hiperlipoproteinemia o la enfermedad.

Para una revisión completa de la fenotipificación de las lipoproteínas, con descripciones de los criterios, véase Fredrickson, D.S. y Lees, R.S.¹⁸.

Se observan notables aumentos de las alfa-lipoproteínas en la enfermedad hepática obstructiva y la cirrosis. Se observan notables disminuciones en la enfermedad hepática parenquimatosa. La enfermedad de Tangier es un trastorno genético raro caracterizado por la ausencia total de alfa lipoproteínas normales. Los heterocigotos muestran niveles disminuidos de alfa lipoproteínas³. Debe indicarse que la hiperestrogenemia (embarazo o uso de anticonceptivos orales) puede producir elevaciones moderadas de las alfa lipoproteínas¹².

LIPOPROTEÍNAS SAS-MX

La abetalipoproteinemia es un defecto primario hereditario que se caracteriza por una deficiencia intensa de todas las lipoproteínas de densidad menor de 1,063 (todas menos las alfa-lipoproteínas). Se acompaña de numerosos síntomas clínicos y la esperanza de vida es limitada. Se han comunicado algunos casos de hipobetalipoproteinemia familiar⁸. Hay algunas pruebas de que la mutación es diferente de la que produce la abetalipoproteinemia.

La lipoproteína X es una lipoproteína anormal que se observa a menudo en pacientes con hepatopatía obstructiva. Consta de colesterol no esterificado (libre), fosfolípidos y proteína VLDL. Migra más lento que la LDL. Debido a su contenido particular en lípidos, se tiñe mal o no se tiñe nada con las tinciones lipídicas habituales, por lo que no suele detectarse mediante la electroforesis estándar de lipoproteínas. La lipoproteína X es claramente visible cuando se usan métodos de tinción enzimática específicos del colesterol.

CONTROL DE CALIDAD

El Control Lipotrol (no de catálogo 5069) puede usarse para verificar todas las fases del procedimiento y debe usarse en cada prueba. Para obtener los valores apropiados de los ensayos, consultar el folleto adjunto en el envase.

LIMITACIONES

El colorante rojo graso 7B, así como todos los colorantes Sudán tienen una afinidad mucho mayor por los triglicéridos y los ésteres del colesterol que por el colesterol libre y los fosfolípidos. Las bandas que se observan después de la tinción con estos colorantes no reflejan una cuantificación verdadera de los lípidos plasmáticos totales¹⁰.

Como la composición lipídica de cada fracción de lipoproteínas es variable, es esencial determinar los niveles de colesterol total y triglicéridos antes de intentar clasificar un patrón^{8,9}. Cuando se trata de diagnosticar o descartar una hiperlipoproteinemia de tipo III, es esencial una cuantificación más definitiva de las lipoproteínas, como una ultracentrifugación⁴ o una electroforesis PAGE¹¹.

VALORES DE REFERENCIA

Se recomienda realizar cualquier evaluación de los geles con respecto a valores normales obtenidos para este test en cada laboratorio individual.

Se realizó un estudio de intervalos normales usando muestras de 48 voluntarios varones y mujeres aparentemente sanos:

Fracción	Intervalo
Alfa-lipoproteínas	14 - 46%
Pre-Beta lipoproteínas	6 - 40%
Beta lipoproteínas	28 - 61,7%
Quilomicrones	0 - 2%

CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES

Precisión dentro de cada prueba: 8 replicaciones de la misma muestra en un solo gel.

Fracción	Media (%)	CV (%)
Alfa lipoproteína	26,3	5,2
Pre-Beta lipoproteína	29,4	4,0
Beta Lipoproteína	44,4	4,3

Precisión entre pruebas: Una misma muestra estudiada en 10 geles diferentes.

Fracción	Media (%)	CV (%)
Alfa-lipoproteína	25,2	9,0
Pre-Beta Lipoproteína	34,7	4,2
Beta lipoproteína	44,0	2,7

BIBLIOGRAFÍA

1. Fredrickson, D.S and Lees, R.S. 'A System For Phenotyping Hyperlipoproteinemias', *Circulation*, 1965; 31(3) : 321-327.
2. Henry, R.J. Ed., 'Clinical Diagnosis and Management of Laboratory Methods', 17th Ed., W.B. Saunders & Co., New York, 194-201, 1984.
3. Lewis, L.A. and Oppet, J.J. Ed., 'CRC Handbook of Electrophoresis Vol II Lipoproteins in Disease', CRC Press Inc., Florida, 63-239, 1980.
4. Levy, R.I. and Fredrickson, D.S. 'Diagnosis and Management of Hyperlipoproteinemia', *Am. J. Cardiol.*, 1968; 22(4) : 576-583.
5. Houstmuller, A.J., 'Agarose-gel Electrophoresis of Lipoproteins: A Clinical Screening Test', Koninklijke Van Gorcum and Comp., The Netherlands, p5, 1969.
6. Stonde, N.J. and Levy, R.I. 'The Hyperlipidemias and Coronary Artery Disease', *Disease-A-Month*, 1972.
7. Dahlen, G. 'The Pre-Beta Lipoprotein Phenomenon in Relation to Serum Cholesterol and Triglyceride Levels: The Lp(a) Lipoprotein and Coronary Heart Disease', *Umea University Medical Dissertations, Sweden, No. 20, 1974.*
8. Fredrickson, D.S., Levy, R.I. and Lees, R.S., 'Fat Transport in Lipoproteins - An Integrated Approach To Mechanisms and Disorders' *N. Eng. J. Med.*, 1967; 276 : 34-42, 94-103, 148-156, 215-226, 273-281.
9. Fredrickson, D.S. 'When To Worry About Hyperlipidemia', *Consultant*, December 1974.
10. Davidsohn, I. And Henry, J.B., Todd-Sanford: 'Clinical Diagnosis by Laboratory Methods', 15th ed., p 639, 1974.
11. Masket, B.H., Levy, R.I and Fredrickson, D.S., 'The Use Of Polyacrylamide Gel Electrophoresis in Differentiating Type III Hyperlipoproteinemia', *J. Lab. Clin. Med.*, 1973 ; 81 (5) : 794-802.
12. World Health Organisation Memorandum: Classification of Hyperlipidemias and Hyperlipoproteinemias', *Circulation*, 1972; 45 : 501-508.