
P-HDL-kolesterol med cobas c 501/701

Medicinsk bakgrund

Analys-/bestämnings-/mätprincip

Apparatur

Bipacksedel

Material

Kontroller

Provtagning och provhantering

Utförande

Resultat/tolkning

Svarsrutiner

Referensintervall

Ersatta metoder

Referenser

Justeringstabell

Medicinsk bakgrund

Av det kolesterol som finns i plasma är omkring 70 % förestrat med långkedjiga fettsyror, medan ca 30 % är oförestrat, s.k. fritt kolesterol. Både förestrat och oförestrat kolesterol ingår i bestämningen av P-Kolesterol. Huvuddelen av plasmakolesterot (60-70 %) transporteras i LDL-fraktionen, medan 25-35 % återfinns i HDL. Mindre mängder kolesterol finns i kylomikroner och VLDL.

Hyperkolesterolemi är en av de viktigaste kardiovaskulära riskfaktorerna. Uttalad ökning av plasmakolesterol förklaras huvudsakligen av ökning i LDL-kolesterol medan lätt hyperkolesterolemi inte sällan kan tillskrivas en ökning av HDL-halten. Separat bestämning av LDL- och HDL-kolesterol fordras för adekvat bedömning av kardiovaskulär risk eftersom LDL anses vara bärare av aterogen risk medan HDL-kolesterol anses ha skyddande effekt.

Förhöjt plasmakolesterol beroende på förhöjd LDL-koncentration ses vid familjär hyperkolesterolemi, familjär dyslipoproteinemi och familjär kombinerad hyperlipoproteinemi. Måttlig till uttalad ökning av LDL-halten uppträder sekundärt vid åtskilliga tillstånd, framför allt hypotyreos, leversjukdomar och njursjukdomar vilket också kan ge sänkt HDL-kolesterol. Förhöjt LDL-kolesterol är också till stor del livsstilsrelaterat, vilket också lågt HDL-kolesterol kan vara. Vid vissa sällsynta genetiska sjukdomar är HDL-kolesterol extremt lågt (Tangiers sjukdom och LCAT-brist).

LDL-kolesterol beräknas enligt Friedewalds formel under förutsättning att triglycerider i serum/plasma är < 4 mmol/L:

$$\text{LDL-Kolesterol} = \text{Kolesterol} - \text{HDL-Kolesterol} - 0,45 \times \text{fS/P-Triglycerider}.$$

Non-HDL kolesterol beräknas enligt formeln: Totalkolesterol – HDL-kolesterol, och är ett bättre mått på den totala aterogena bördan än LDL-kolesterol. Non-HDL kolesterol har i många studier visat sig vara bättre på att förutsäga risk för kardiovaskulär sjukdom än LDL-kolesterol, särskilt hos patienter med diabetes, metabolt syndrom och/eller hypertriglyceridemi.

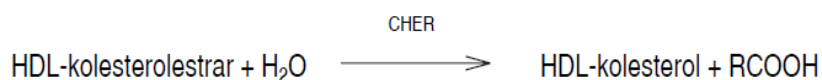
Analys-/bestämnings-/mätprincip

Enzymatisk, kolorimetrisk analys.

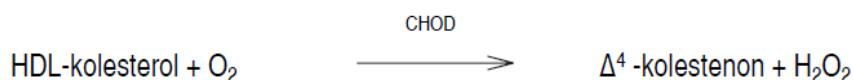
2-punkt end. med en ökning i reaktionsriktning.

Roche HDLC4 är en direktmetod. Den automatiserade HDLC4-analysen använder detergent, kolesterolsteras (CHER), kolesteroloxidas (CHOD) och peroxidas för att bilda ett färgpigment som mäts optiskt.

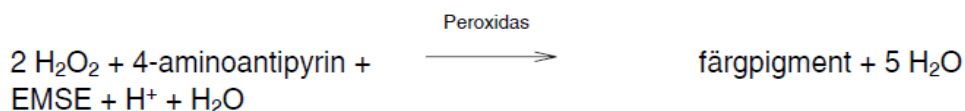
Icke-HDL-lipoproteiner, t.ex. LDL, VLDL och kylomikroner kombineras med polyanjoner och en detergent och bildar ett vattenlösligt komplex. I detta komplex är den enzymatiska reaktionen av CHER och CHOD blockerad mot icke-HDL-lipoproteiner. Slutligen kan endast HDL-partiklar reagera med CHER och CHOD (se reaktionsformeln nedan). Koncentrationen av HDL-kolesterol bestäms enzymatiskt av CHER och CHOD. Kolesterolstrar bryts ner kvantitativt till fritt kolesterol och fettsyror av CHER.



I närvaro av syre oxideras kolesterol med kolesteroloxidas till Δ^4 -kolestenon och väteperoxid.



I närvaro av peroxidas reagerar den bildade väteperoxiden med 4-aminoantipyrin och EMSE* och bildar en färg. Färgintensiteten står i direkt proportion till kolesterolkoncentrationen och mäts fotometriskt vid 700/600 nm.



*EMSE = N-etyl-N-(3-metylfenyl)-N'-succinyletylendiamin

Apparatur

cobas c 501/701

Roche Diagnostics
Scandinavia AB

Bipacksedel

Bipacksedlar från kontroller och kalibratorer sparas (om ny lot) i separata pärmar på sektionen. Information förmedlas till metodansvarig för analysen. Annan information från firman sätts in i metodloggboken eller sparas på G-mappen. Alla nya lotnummer ska skrivas in i QM.

Material

Reagens

För utförlig information om delar av reagensinnehåll se produktregister i kemikaliehanteringssystemet KLARA på Lisa:

http://www.port.se/alphaquest/app_lin/pcmain.cfm.

För systemlösningar till cobas 6000 och cobas 8000, se respektive apparatbeskrivning [cobas 6000](#) och [cobas 8000](#)

HDL-kolesterol (HDLc4) Reagens

Roche Diagnostics
Scandinavia AB

Innehåller

R1 (position B):	TAPSO-buffert	62,1 mmol/L, pH 7,77
	polyanjon	1,25 g/L
	EMSE	1,08 mmol/L
	Askorbatoxidas (pumpa)	> 50 µkat/L
	Peroxidas (pepparrot)	> 166,7 µkat/L
	Detergent	
	BSA	2,0 g/L
	Konserveringsmedel	
R3: (US) R2: (ViN/LiM)	Bis-Tris-buffert	20,1 mmol/L, pH 6,70
(position C)	Kolesterolesteras (mikroorganism)	> 7,5 µkat/L
	Kolesteroloxidas (rekombinant E. coli)	> 7,17 µkat/L
	Kolesterolesteras (mikroorganism)	> 76,7 µkat/L
	Peroxidas (pepparrot)	> 333 µkat/L
	4-aminoantipyrin	1,48 mmol/L
	BSA	3,0 g/L
	Detergent	
	Konserveringsmedel	

En reagensförpackning räcker till 500 analyser (US), 350 analyser (ViN/LiM).

Utförande

US: Reagenset är klart att använda. Placera i rotor **B**.

OBS Ta av korkarna på reagenskassetten innan isättning i instrumentet och undvik skumbildning. Sätt i kassetten med den vita delen av RFID-etiketten åt vänster (RFID-etiketten sitter ovanpå reagenset). Vilken plats i reagensrotorn den sätts i spelar ingen roll. Gör en "Reagens registrering", se apparatbeskrivning [cobas 8000](#).

ViN/LiM: Reagenset är klart att använda. Reagenskassetter kan laddas under drift. Sätt i kassetten med streckoden åt höger i kassetporten. Kassetten laddas in automatiskt av instrumentet.

Hållbarhet

Oöppnad förpackning	Till utgångsdatum vid 2-8°C
Öppnad förpackning kyld i instrumentet	4 veckor (US) 12 veckor (ViN/LiM)

DiluentRoche Diagnostics
Scandinavia AB**Innehåller**

NaCl 9 %

Utförande**US:** Reagenset är klart att använda. Placera i rotor **B**.**OBS** Ta av korkarna på reagenskassetten innan isättning i instrumentet och undvik skumbildning. Sätt i kassetten med den vita delen av RFID-etiketten åt vänster (RFID-etiketten sitter ovanpå reagenset). Vilken plats i reagensrotorn den sätts i spelar ingen roll. Gör en "Reagens registrering", se apparatbeskrivning [cobas 8000](#).**ViN/LiM:** Reagenset är klart att använda. Reagenskassetter kan laddas under drift. Sätt i kassetten med streckoden åt höger i kassettporten. Kassetten laddas in automatiskt av instrumentet.**Hållbarhet**

Oöppnad förpackning	Till utgångsdatum vid 2-8°C
Öppnad förpackning kyld i instrumentet	4 veckor (US) 12 veckor (ViN/LiM)

Kalibratorer/kalibrering

Kalibratorer innehåller humanplasma. Dessa är kontrollerade mot HIV och hepatit B och funna negativa, men eftersom dessa metoder ej är helt säkra bör alla kalibratorer behandlas som humana prover.

C.f.a.s. LipidsRoche Diagnostics
Scandinavia AB**Spårbarhet**

Denna metod har standardiserats mot den angivna CDC referensmetoden (ultracentrifugeringsmetod, se metodblad). Standardiseringen motsvarar kraven för "HDL Cholesterol Method Evaluation Protocol for Manufacturers" från US National Reference System for Cholesterol, CRMLN (Cholesterol Reference Method Laboratory Network), November 1994.

Innehåller

Lyofiliserad humanserumbaserad kalibrator, (3 x 1 mL).

OBS Viktigt! Natriumazid ingår i kalibratoren. Natriumazid är giftigt och kan resorberas genom huden varför handskar skall användas. Natriumazid kan även reagera med bly- eller kopparrörledningar och bilda explosiva metallazider. Spola därför med stora mängder vatten vid kassering för att förhindra ansamling av azid.

Beredning

Öppna flaskan försiktigt och tillsätt exakt 1,0 mL typ I-vatten/typ II-vatten. Blanda på rörvändare i 30 minuter. Undvik skumbildning.

Portionera upp 500 µl (US) / 300 µl (ViN/LiM) i eppendorfkoppar och frys in.

Utförande

2-punktskalibrering. Kalibrering krävs vid reagenslotbyte.

För utförande se respektive apparatbeskrivning [cobas 6000](#) och [cobas 8000](#).

Hållbarhet

Oöppnad förpackning

Uppspädd kalibrator

Till utgångsdatum vid 2-8°C

5 dagar i kyl

1 månad i frys

Kontroller

Kontroller innehåller humanplasma. Dessa är kontrollerade mot HIV och hepatit B och funna negativa, men eftersom dessa metoder ej är helt säkra bör alla kontroller behandlas som humana prover.

Intern kvalitetskontroll

Se respektive apparatbeskrivning [cobas 6000](#) och [cobas 8000](#).

Alla interna kontroller överförs till QM där medelvärde, SD och CV beräknas.

Löpande kontroller hanteras och tekniskt godkännande sker enligt dokument [Metodkontroll, kontrollhantering, Klinisk farmakologi, Klinisk immunologi och transfusionsmedicin, Klinisk kemi](#).

För övrigt se [Metodkontroll QM-rutiner med flödesschema](#).

Extern kvalitetskontroll

Kontrollen analyseras på samma sätt som ett patientprov. Resultaten från denna kontroll läggs in i QM. Efter varje analystillfälle av extern kontroll erhålls en sammanställning avseende vår position i jämförbar metodgrupp.

Se dokument [Externa kontrollprogram, Klinisk kemi och Klinisk farmakologi](#).

Mentorinstrument deltar i extern kvalitetssäkring. För övriga instrument sker jämförelse mot mentorinstrument med patientprovsinskick. Resultatet av varje enskilt instruments jämförelse mot mentorinstrumentet finns tillgänglig i QM under respektive instrument.

Se även dokument [Metodkontroll, kontrollhantering, Klinisk farmakologi, Klinisk immunologi och transfusionsmedicin, Klinisk kemi](#).

Provtagning och provhantering

Vid provtagning för bestämning av P-LDL och triglycerider ska patienten i regel vara fastande minst 10 h. Vid bestämning av enbart P-HDL, kolesterol och non-HDL kolesterol behöver patient inte vara fastande.

Ta blodprov i vakuumrör innehållande separationsgel och litiumheparin. Serum kan också användas.

Centrifugeras inom 12 h från provtagning.

Centrifugerat primärrör (med gel) hållbart minst 30 h vid 2-8 °C.

Vid längre tids förvaring ska plasma avskiljas och kan då förvaras upp till 5 dygn vid 2-8 °C.

Vid förvaring > 5 dygn ska plasma avskiljas och frysas (-20 °C). Undvik upprepade frysning och tining.

Hållbarheten i okorkade rör, förvarade i rumstemperatur, är acceptabel i max 6 h.

Undantag är kapillärt tagna prover (fr. a. barnprover), där hållbarheten bedöms till max 2 h. Underlaget för hållbarhetstest finns under ALAT-fliken i dokumentskåpet på Klinisk kemi US.

Utförande

Förberedelser

Provet centrifugeras 10 minuter vid 1800 g (RCF) alternativt 5 minuter vid 2400 g (RCF). För transportbanan på US gäller 2500 g (RCF) i 10 minuter.

Analys/bestämning

Se respektive apparatbeskrivning [cobas 6000](#) och [cobas 8000](#).

Resultat/tolkning

Beräkning

Om provet är utanför mätintervallet omanalyseras provet automatiskt och resultatet beräknas av cobas c 501/701. (spädning 1:2).

US

Om resultatet ändå larmas ska provet beställas om i cITm med en högre spädning än den automatiska (max 1:50). Resultatet beräknas av cobas c 701. Räcker inte denna spädning måste provet spädas manuellt med NaCl samt multipliceras med spädningsfaktorn.

ViN/LiM

Om resultatet ändå larmas ska provet beställas om i instrumentet med en högre spädning än den automatiska. Resultatet beräknas av cobas c 501. Räcker inte denna spädning måste provet spädas manuellt med NaCl samt multipliceras med spädningsfaktorn.

Precision (total mätosäkerhet)

Se metodvalideringar i dokumentskåp samt internt kvalitetssystem (QM). Kontrollnivå och mätosäkerhet för metoden finns i QM.

Riktighet

För cobas c 501 (ViN/LiM) och cobas c 701 (US) är jämförelse utförd mot mentorn Advia 1800 (US). Se respektive metodvalidering.

HDLC4 reagenset är jämfört mot HDLC3 reagenset på cobas 501 och c 701, se metodvalideringar.

Mätområde

0,08 – 3,88 mmol/L. Automatisk omkörning utökar mätområdets övre gräns (spädning 1:2) till 7,76 mmol/L. Se även rubriken Beräkning.

Detektionsgräns

Nedre detektionsgräns är 0,08 mmol/L enligt Roches metodblad.

Interferenser

Enligt Roches metodblad:

Ikterus: Ingen signifikant interferens vid ett I-index på upp till 60 för konjugerat bilirubin och 60 för okonjugerat bilirubin, ungefärlig koncentration: 1026 µmol/L. Om I-index är > 60 ersätts svaret med kommentaren "ikteriskt".

Hemolys: Ingen signifikant interferens vid ett H-index på upp till 1200 för hemoglobin, ungefärlig koncentration 12 g/L. Om H-index är >1000 ersätts svaret med kommentaren hemolys.

Lipemi (intralipid): Ingen signifikant interferens vid ett L-index på upp till 2000. Det är dålig korrelation mellan L-index (motsvarar turbiditet) och triglyceridkoncentration. Ingen signifikant interferens från naturliga triglycerider upp till 13,7 mmol/L.

Förhöjda koncentrationen av fria fettsyror och denaturerade proteiner kan orsaka falskt förhöjda HDL-kolesterolresultat.

Askorbinsyra upp till 2,84 mmol/L interfererar ej.

Läkemedel: Ingen interferens påvisades för terapeutiska koncentrationer vid användning av vanliga läkemedelspaneler.

Acetylcystein i höga doser som ges vid behandling av paracetamol-intoxikation kan ge falskt låga värden. Även **Paracetamol** i sig kan via en metabolit (NAPQI) interferera med HDL-kolesterolmetoden om patienten intagit > 10 g vid ett enskilt tillfälle eller under samma dygn.

I sällsynta fall kan förhöjda **immunglobulinkoncentrationer** leda till falskt förhöjda HDL-kolesterolresultat.

I mycket sällsynta fall kan **gammopati**, särskilt typ IgM (Waldenströms makroglobulinemi), orsaka icke tillförlitliga resultat.

Bedömning

Bestämning av Kolesterol, HDL-kolesterol, triglycerider och beräkning av LDL-kolesterol och/eller non-HDL-kolesterol i serum/plasma bör ingå i utredning av primära och sekundära hyperlipoproteinemier och vid bedömning av kardiovaskulär risk. Lipidstatus bör dock ej analyseras under det akuta insjuknandet i hjärtinfarkt då sänkningar ses av både HDL och LDL. Provtaget under första dagen av insjuknandet alt. tidigast en månad efter infarkten är att föredra.

Målvärdet för LDL-kolesterol vid sekundärprevention är lägre än vad övre referensgränsen anger. Målvärdet varierar mellan 1,8 och 3,0 mmol/L beroende på förekomst av andra riskfaktorer för hjärtsjukdom. Målvärdet för non-HDL kolesterol kan variera mellan 2,6 och 3,8 mmol/L. Detta motsvarar då målvärdet för LDL + 0,8 mmol/L [6]. Målvärdet för LDL-kolesterol bör individualiseras och baseras på risk enligt rekommendationer från EAS/ESC och SCORE diagrammet (risk för död inom 10 år i hjärt-kärlsjukdom). För måttlig risk (SCORE 1-5 %) gäller målvärde <3,0 mmol/L, för hög risk (SCORE 5-10 %) gäller målvärde <2,5 mmol/L och för mycket hög risk (SCORE > 10 %) gäller målvärde <1,8 mmol/L. Vid sekundärprevention (tidigare hjärt-kärlsjukdom), diabetes med andra riskfaktorer eller komplikationer samt vid uttalad njursjukdom (ej dialyspatienter) ingår patienten i gruppen "mycket hög risk" [6,7].

Svarsrutiner

Svar lämnas med 2 siffrors noggrannhet.

Ex. 1,2 mmol/L

Resultat <0,10 svaras ut som "<0,10 mmol/L".

Referensintervall

HDL-kolesterol

Män: 0,80 - 2,1 mmol/L

Kvinnor: 1,0 - 2,7 mmol/L

Följande kommentar medföljer varje svar: "Värden < 1,0 mmol/L är förenade med ökad risk för kardiovaskulär sjukdom."

LDL-kolesterol

18-30 år: 1,2 - 4,3 mmol/L

31-50 år: 1,4 - 4,7 mmol/L

> 50 år: 2,0 - 5,3 mmol/L

Referensintervall enligt NORIP [4]

Följande kommentar medföljer varje svar: "Målvärden enl. EAS/ESC: Måttlig risk: <3,0 Hög risk: <2,5 Mycket hög risk: <1,8 mmol/L".

Non-HDL kolesterol

Referensintervall anges ej.

Följande kommentar medföljer varje svar: "Riskanpassat målvärde för LDL-kolesterol plus 0,8 mmol/L".

Ersatta metoder

Klinisk kemi US

fP-HDL-Kolesterol med Hitachi 911

fS-Kolesterol, fS-HDL-kolesterol med Multistat Plus (1983)

fP-HDL-Kolesterol med Hitachi 717 (1989)

fP-HDL-Kolesterol med Hitachi 911 (1996)

fP-HDL-Kolesterol med Hitachi 917 (1998)

P-HDL-Kolesterol med Advia 1650 (utgåva 2; 2002)

P-HDL-Kolesterol med Advia 1650 (utgåva 3; 2003)

P-HDL-Kolesterol med Advia 1650 (utgåva 4, 2005)

P-HDL-Kolesterol med Advia 1650 (utgåva 5, 2006)

P-HDL-Kolesterol med Advia 1800 (2007)

P-HDL-Kolesterol med cobas c 701 (2015)

Klinisk kemi VIN

fS/fP-HDL-Kolesterol (fällningsmetod) med Hitachi 911 (1993)

fS/fP-HDL-Kolesterol med Hitachi 911 (1997)

P-HDL-Kolesterol med Advia 1650 (utgåva 2; 2002)

P-HDL-Kolesterol med Advia 1650 (utgåva 3; 2003)

P-HDL-Kolesterol med Advia 1650 (utgåva 4, 2005)

P-HDL-Kolesterol med Advia 1650 (utgåva 5, 2006)

P-HDL-Kolesterol med Advia 1800 (2014)

P-HDL-Kolesterol med cobas c 501 (2015)

Klinisk kemi LiM

P-HDL-Kolesterol med Vitros 250 (1998)

P-HDL-Kolesterol med Konelab 20 (2001)

P-HDL-Kolesterol med Advia 1650 (2007)

P-HDL-Kolesterol med Advia 1200 (2011)

P-HDL-Kolesterol med cobas c 501 (2015)

Referenser

1. Lopez-Virella, M.F., et al. Cholesterol Determination in High-Density Lipoproteins Separated by Three Different Methods. *Clin.Chem.* 1977; 23: 862.
2. Sugiuchi H, et al *Clin. Chem.* 1995; 41: 717-723.
3. Nilsson-Ehle P, Berggren Söderlund M, Theodorsson E (red.). *Laurells Klinisk Kemi i praktisk medicin*. 9:e uppl. 2012.
4. Simonsson P, Mårtensson A, Rustad P *Läkartidningen* 2004; 101(10):901.
5. Charlton-Menys V. et al. Targets of Statin Therapy: LDL Cholesterol, Non-HDL Cholesterol, and Apolipoprotein B in Type 2 Diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS). *Clin.Chem* 2009; 55(3):473-480.
6. Željko Reiner et al. *guidelines: ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS) Eur Heart J* (2011) 32(14): 1769-1818.
7. Wiklund O. Lika huvudbudskap i riktlinjer för lipider för hjärt-kärlprevention. *Läkartidningen* 2014; 111 CSFW
8. Traceability and Uncertainty, Roche Diagnostics GmbH, maj 2015.
9. Metodblad HDLC4, Roche Diagnostics, 2017-03, v 1,0.
10. Metodblad C.f.a.s. Lipids, Roche Diagnostics, 2017-04, v 6,0.

Justeringstabell

Version	Avsnitt samt principiellt vad som ändrats	Ansvarig
1	Dokumentet överfört från Platina till Dokumenta.	C Sundström
2	Implementerat ny metodmall med nya rubriker. Kalibrator/kalibrering: Ändrat infrysningvolymen från 300 till 500 µl på US. Beräkning: Förtydligat. Referenser: Uppdaterat. Referensintervall och Bedömning: Ändrat målvärde vid måttlig risk från 3,5 till 3,0 mmol/L.	M Skala E Landberg
3	Ny metod med förbättrad specificitet för HDL-kolesterol pga minskad känslighet mot denaturerade lipoproteiner. Analys/bestämning/mätprincip: Marginell ändring av metoden. Reagens: Nytt reagens HDLC4. Resultat/tolkning: Lagt till reagensjämförelse under Riktighet, ändrat övre gräns under Mätområde och ändrat gränserna för ikterus och lipemi under Interferenser. Referenser: Uppdaterat.	M Skala
4	Begränsning av läsrättighet till laboratoriemedicin	C Sundström