

# Vergleich einer kinetischen Nephelometrie mit einem immunoradiometrischen Assay für die Bestimmung von Lipoprotein(a)

Comparison of a Kinetic Nephelometry with an Immunoradiometric Assay for the Determination of Lipoprotein(a)

M. Bender<sup>1,2</sup>, W. Groß<sup>1</sup>

**Zusammenfassung:** Die Bestimmung von Lipoprotein(a) im Plasma mittels kinetischer Nephelometrie (Beckman Instruments) wurde mit einem immunoradiometrischen Assay (Mercodia) verglichen. Untersucht wurden 182 Proben in frischem Zustand und 18 Proben, die für kurze Zeit bei  $-25^{\circ}\text{C}$  gelagert waren. Die Meßergebnisse zeigen eine gute Übereinstimmung der Medianwerte (147 mg/l bzw. 160 mg/l) und eine gute Korrelation bei den frischen und den eingefrorenen Proben ( $r = 0,971/r_s = 0,985$  bzw.  $r = 0,971$ ). Die Variationskoeffizienten der Nephelometrie entsprechen mit 4,2% in der Serie (Intraassay) und 5,5-6,5% von Tag zu Tag (Interassay) den bisherigen Literaturwerten. Entgegen der Empfehlung, nur frisches Probenmaterial für die Nephelometrie einzusetzen, wurde bei einer Probe mit einer hohen Lipoprotein(a) Konzentration (960 mg/l) über 5 Wochen keine bedeutende Abnahme der Meßwerte registriert. Um den Einfluß der Triglyzeridkonzentration auf die Lp(a) Bestimmung zu untersuchen, wurden sechs Plasmaproben mit Triglyzeridwerten  $> 5,75$  mmol/l ausgewählt und in verschiedenen Verdünnungen mit Triglyzeridkonzentrationen zwischen 3,45-8,05 mmol/l analysiert. Während 4 Proben keinen Einfluß der Triglyzeridkonzentration zeigten, wurde bei 2 Proben ein geringer Abfall der Lipoprotein(a) Meßwerte mit steigender Triglyzeridkonzentration beobachtet.

**Schlüsselwörter:** Lipoprotein(a)/Analytik; Nephelometrie und Turbidimetrie; Lipämie.

**Summary:** In this paper two methods are compared for determining lipoprotein(a) plasma concentrations, a rate nephelometry (Beckman Instr.) and an immunoradiometric assay (Mercodia) for reference. 182 fresh samples and 18 frozen samples ( $-25^{\circ}\text{C}$ ) were analyzed. The results of these measurements showed that

the median values (147 mg/l and 160 mg/l) corresponded to each other and the correlation coefficients for the fresh and frozen samples were  $r = 0,971/r_s = 0,985$  and  $r = 0,958$  respectively. The coefficients of variation of the nephelometric method were determined as 4.2% for intra- and 5.5-6.5% for interassay conditions, in good agreement to literature values. Although fresh samples are recommended for the nephelometric measurement we found no considerable decrease in lipoprotein(a) values in a sample containing 960 mg/l Lp(a) on storage at  $4^{\circ}\text{C}$  for up to 5 weeks. Triglyceride concentration affects the nephelometric measurements by increasing the turbidity of the samples. We therefore examined the influence of triglyceride concentration in 6 plasma samples with triglyceride values  $> 5.75$  mmol/l and each in varying triglyceride concentrations between 3.45-8.05 mmol/l. Four samples showed no influence of the triglyceride concentration and two samples showed a slight decrease in lipoprotein(a) values with increasing triglyceride concentration.

**Keywords:** Lipoprotein(a)/analysis; Nephelometry and Turbidimetry; Lipemia.

Lipoprotein(a) wurde in zahlreichen klinischen Studien der letzten Jahre als unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung der Atherosklerose erkannt [1-4]. Die physiologische Funktion sowie die Pathobiochemie von Lp(a) sind allerdings noch weitgehend ungeklärt [5]. Als cholesterinreiches Lipoprotein ist die Struktur von Lp(a) den LDL sehr ähnlich. Allerdings besitzt Lp(a) ein zusätzliches Apolipoprotein(a) [Apo(a)], das kovalent über eine Disulfidbrücke an Apo B gebunden ist. Apo(a) ist ein Glykoprotein mit einem genetisch bedingten Größenpolymorphismus, der zu 34 Isoformen mit Molekulargewichten von 350 bis 750 kDa führt [6].

Für die Konzentrationsbestimmung von Lp(a) steht eine Reihe immunologischer Verfahren wie Elektromunoassay [4, 7], Enzymimmunoassay [8-11], immunoradiometrischer [12, 13] und lumineszenzmarkierter immunometrischer Assay [14] zur Verfügung.

<sup>1</sup>Gustav Ermbden Zentrum der Biologischen Chemie, Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt/Main, Deutschland

<sup>2</sup>Korrespondenzadresse: Dipl. Biol. Michael Bender, Gustav Ermbden Zentrum der Biologischen Chemie, Johann Wolfgang Goethe Universität, Theodor-Stern-Kai 7, D-60590 Frankfurt/Main. Fax: +49-69-6301-5937

Eingegangen: 10. Juli 1998 / Angenommen: 3. Dezember 1998

die sich im Hinblick auf Richtigkeit, Präzision und Automatisierung zum Teil erheblich unterscheiden [9]. Auf die methodischen Probleme bei der immunologischen Bestimmung von Lp(a) wurde in einigen Arbeiten bereits hingewiesen [13, 15, 16]. Über die Probenbehandlung und die Stabilität von Lp(a) liegen bisher wenig übereinstimmende Arbeiten vor [17, 18].

Ziel dieser Untersuchungen war es, den seit einigen Jahren in unserem Labor eingesetzten immunoradiometrischen Assay (Mercodia) [8, 9, 19] mit einer automatisierten nephelometrischen Methode (Beckman) zu vergleichen [20, 21]. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der kinetischen Nephelometrie; sie wurde bisher nur mit anderen nephelometrischen und turbidimetrischen Methoden und einer Immundiffusionsmethode verglichen [20].

## Material und Methoden

### Plasmen

Untersucht wurden 182 Plasmen nüchterner Patienten beiderlei Geschlechts, die aus dem Untersuchungsgut der klinisch-chemischen Routineanalytik entnommen wurden. Die Blutproben wurden in EDTA-Röhrchen frisch aufgearbeitet. Für die IRMA-Bestimmung wurde ein Teil des gewonnenen Plasmas bei  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren und gelagert, während das restliche Plasma für die Nephelometrie bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde und innerhalb von 5 Tagen analysiert wurde.

### Kinetische Nephelometrie

Die Durchführung der Lp(a) Bestimmungen erfolgte an einem Array Protein System (Beckman Instruments, California, USA). Der Lp(a) Antikörper und der Kalibrator wurden gemäß den Herstellerangaben eingesetzt. Die Plasmaproben wurden zunächst mit einem Detergenz im Verhältnis 1:6 verdünnt und nach 5 min zentrifugiert (5 min bei 1000 g). Der Überstand wurde für die Antigen-Antikörper-Reaktion eingesetzt. Die entstehende Streulichtzunahme wurde vom System in ein Signal umgewandelt und der Kalibration entsprechend in Konzentrationseinheiten umgerechnet. Der Meßbereich für diese Methode umfaßt 20-1280 mg/l.

Für die kinetische Nephelometrie wird vom Hersteller eine Triglyzeridkonzentration über 5,75 mmol/l als Störgröße angegeben. Um diese Grenze genauer zu untersuchen, wurden sechs Plasmaproben mit hohen Triglyzeridwerten ( $\text{TG} > 5,75\text{ mmol/l}$ ) und hohen Lp(a)-Werten ausgewählt und die TG-Konzentration auf 3,45-5,75 mmol/l bzw. 3,45-8,05 mmol/l mit 0,9% NaCl-Lösung eingestellt und für den Test eingesetzt. Zwei der Plasmaproben (X507;X471) waren ca. 6 Monate bei  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert, die anderen waren bis zu 3 Wochen bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**Abkürzungen:** Lp(a), Lipoprotein(a); LDL, low density lipoprotein; Apo B, Apolipoprotein B; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IRMA, immunoradiometric assay.

### Immunoradiometrischer Assay (IRMA)

Die immunoradiometrische Bestimmung von Lp(a) erfolgte mit einem kommerziellen Assay (Mercodia Diagnostics AB, Uppsala, Schweden) nach Anleitung des Herstellers. Im Testansatz sind zwei monoklonale Antikörper gegen Lp(a) im Überschuß vorhanden. Apo(a) reagiert sowohl mit dem an Sepharosepartikel gebundenen monoklonalen Antikörper cl280 (capturing antibody) als auch mit dem  $^{125}\text{I}$ -markierten monoklonalen Antikörper cl356 (tracer antibody). Nach einer Inkubationszeit von 60 min wurde der an Sepharosepartikel gebundene Antigen-Antikörper-Komplex von freiem Antikörper durch Zentrifugation abgetrennt, der Überstand dekantiert und die Radioaktivität im Sediment mit einem  $\gamma$ -Counter ermittelt. Die Auswertung wurde anhand einer Standardkurve vorgenommen. Der so in der Einheit U/l ermittelte Wert wurde mit dem Faktor 7 multipliziert, um die Lp(a) Konzentration in mg/l zu erhalten. Der Meßbereich bei dieser Methode liegt nach Herstellerangaben zwischen 1,4 mg/l und 15 g/l.

### Reproduzierbarkeitsprüfung

Zur Bestimmung der Präzision in der Serie wurde eine Probe jeweils zwanzigfach mit beiden Methoden analysiert. Für die Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag wurden für den IRMA die im Assay enthaltenen Kontrollproben „low“ und „high“ bei 20 Tests eingesetzt. Für die nephelometrische Bestimmung wurden zwei Plasmaproben an 20 verschiedenen Tagen verwendet. Die Richtigkeit der Analysen wurde überprüft, indem die IRMA-Kontrollprobe bzw. der Nephelometer-Kalibrator mit der jeweils anderen Methode bestimmt und die Abweichung vom Zielwert berechnet wurde.

### Statistik

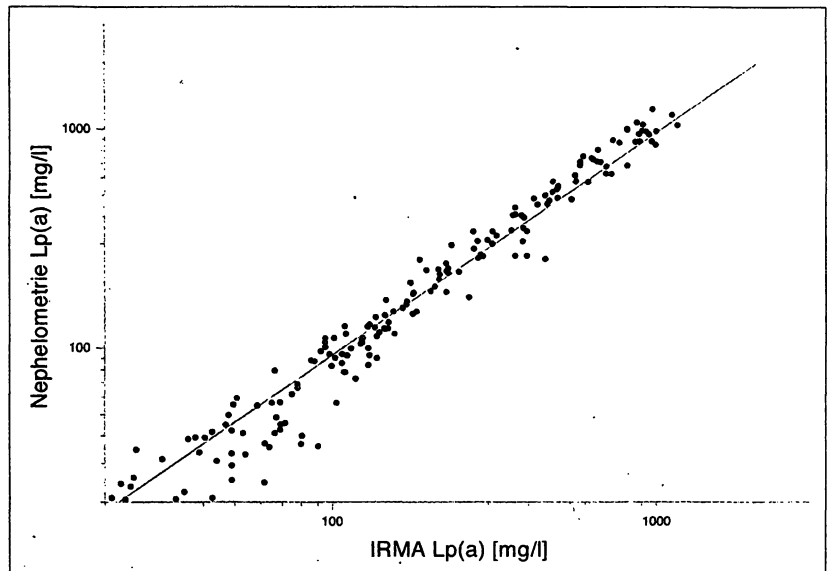
Da Lp(a) eine ausgeprägte linkssteile Verteilung aufweist (Mittelwert:Median  $> 1,5$ ), wurde der Median benutzt und die lineare Regression nach logarithmischer Transformation durchgeführt (logarithmische Normalverteilung [25]). Für die Auswertung wurden nicht-parametrische Statistikverfahren verwendet, und die Korrelation wurde mit dem Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten ( $r_s$ ) ermittelt.

## Ergebnisse

In den 182 untersuchten Plasmaproben aus der Routineanalytik beträgt der Median der Lp(a)-Konzentrationen mit dem IRMA 160 mg/l und mit der nephelometrischen Bestimmung 147 mg/l. In Abbildung 1 sind die Ergebnisse der beiden Methoden in logarithmischer Skalierung gegeneinander aufgetragen. Die logarithmische Transformation liefert die Geradengleichung  $\log(y) = 1,02 \log(x) + 0,05$ . Der Korrelationskoeffizient beträgt hierbei  $r = 0,971$ . Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman errechnet sich zu  $r_s = 0,985$ .

**Tabelle 1** Reproduzierbarkeit und Präzision der kinetischen Nephelometrie und des IRMA im Vergleich

	Intraassay		Interassay			
	IRMA	Nephelometrie	IRMA	IRMA	Nephelometrie	Nephelometrie
Lp(a)-Mittelwert [mg/l]	90,4	91,7	139,9	383,4	470,7	740,4
Standardabweichung [mg/l]	3,2	3,8	17,6	44,4	26,0	48,4
Anzahl der Messungen (n)	20	20	20	20	20	20
Variationskoeffizient [%]	3,5	4,2	12,5	11,6	5,5	6,5
Gesamt-VK [%]	12,5	7,3				



**Abbildung 1** Bestimmung von Lipoprotein(a) mittels kinetischer Nephelometrie und einem immunoradiometrischen Assay bei frischen Plasmaproben (n = 182). Nach logarithmischer Transformation besitzt die Regressionsgerade folgende Gleichung:  $\log(y) = 1,06 \log(x) + 1,5$  und der Regressionskoeffizient beträgt  $r = 0,971$ .

Tabelle 1 zeigt die ermittelten Variationskoeffizienten für beide Methoden. Für den IRMA ergibt sich ein Gesamtvariationskoeffizient von 12,5% (3,5% Intra- und 12,0% Interassay) und für die Nephelometrie 7,3% (4,2% Intra- und 6,0% Interassay). Die schlechte Reproduzierbarkeit bei den IRMA Bestimmungen resultiert also im wesentlichen aus den Interassay Abweichungen und ist vermutlich durch das aufwendige Probenhandling bedingt. Die gegenseitige Bestimmung der Kontrollproben- bzw. der Kalibratorlösungen zeigt gravierende Abweichungen (Tabelle 2)

von 65% bzw. 74% von den deklarierten Werten. Offenbar ist die Kalibration der Lp(a) Bestimmungen methodenabhängig, wie dies schon in anderen Arbeiten gefunden wurde [9, 22].

Parallel zu diesen Messungen wurden 18 Proben für maximal 3 Wochen bei -25 °C gelagert, um den Einfluß des Einfrierens bei kurzer Lagerungsdauer zu untersuchen. Die Ergebnisse hierzu sind in Abbildung 2 dargestellt. Nach logarithmischer Transformation lautet die Regressionsgeradengleichung  $\log(y) = 1,21 \log(x) - 0,67$ . Der Korrelationskoeffizient beträgt  $r = 0,971$ .

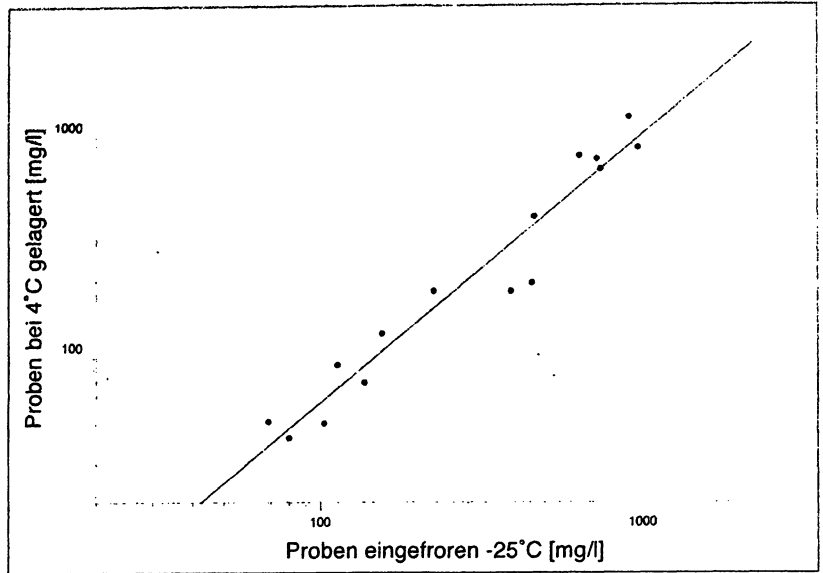
Für eine Plasmaprobe (Lp(a) Konzentration 980 mg/l) wurde die Stabilität über 5 Wochen bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C bestimmt (Abbildung 3). Es zeigt sich eine gute Stabilität der Probe mit einem minimalen Abfall der Konzentration.

Hohe Plasmatriglyzeridkonzentrationen verursachen eine Trübung und stören so die nephelometrischen Bestimmungen. Auch für die hier eingesetzte Lp(a)-Bestimmungsmethode wurde dieser Effekt beobachtet [20]. Deshalb wurden 6 Proben untersucht, die hohe Triglyzeridkonzentrationen (> 5,75 mmol/l) aufwiesen und deren Lp(a)-Werte den Meßbereich (20-1280 mg/l)

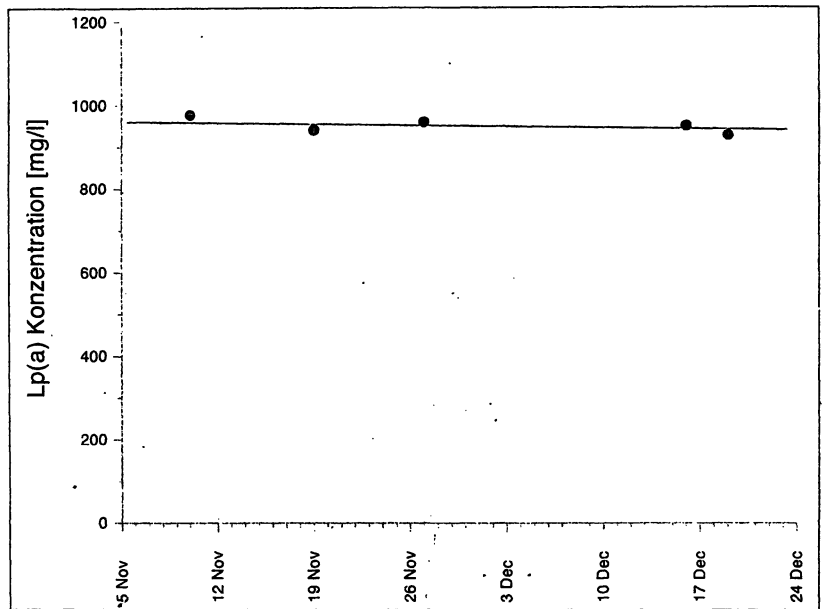
**Tabelle 2** Richtigkeit der Analyseergebnisse bei Referenzmaterialien (IRMA-Kontrollprobe und Array Kalibrator)

Referenzmaterial [Sollwert]	IRMA	Nephelometrie
Array Kalibrator [740 mg/l]	1220 mg/l	-
IRMA Kontrolle [140 mg/l]	-	36 mg/l
Abweichung [%]	+ 65	-74

**Abbildung 2** Bestimmung von Lipoprotein(a) mittels kinetischer Nephelometrie und einem immunoradiometrischen Assay (n = 18) bei eingefrorenen Plasmaproben. Nach logarithmischer Transformation besitzt die Regressionsgerade folgende Gleichung:  $\log(y) = 1,20 \log(x) - 0,66$  und der Regressionskoeffizient beträgt  $r = 0,971$ .



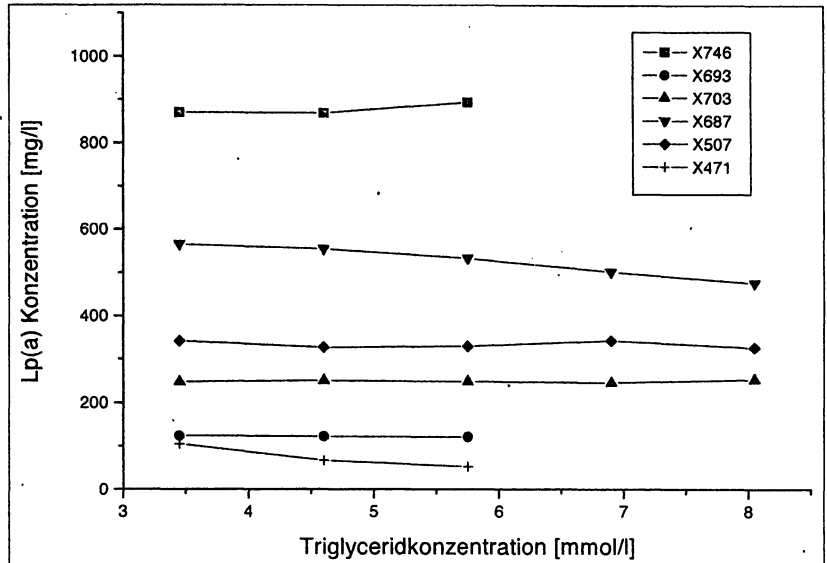
**Abbildung 3** Stabilität einer Plasmaprobe mit einer hohen Lipoprotein(a) Konzentration über einen Zeitraum von 5 Wochen



weitgehend abdecken. Die Proben wurden in verschiedenen Verdünnungen von 3,45-5,75 mmol/l bzw. 3,45-8,05 mmol/l Triglyzeride untersucht. Die Ergebnisse in Abbildung 4 zeigen bei vier Proben jeweils einen konstanten Lp(a)-Wert über den gesamten Bereich der Triglyceridkonzentrationen (3,45-8,05 mmol/l). Bei zwei Proben sinkt die ermittelte Lp(a)Konzentration kontinuierlich mit steigender Triglyzeridkonzentration. Zwei der Proben (X507, X471) waren etwa 6 Monate bei -25 °C eingefroren und zeigen bei diesen Versuchen kein auffälliges Stabilitätsverhalten.

## Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Konzentrationsbestimmung von Lp(a) mittels immunoradiometrischen Assay und kinetischer Nephelometrie verglichen. Die IRMA-Methode wurde hier als Referenz gewählt, da dieser Test in unserem Labor bereits mit anderen Methoden verglichen wurde [9]. Die Lp(a) Bestimmung mit der kinetischen Nephelometrie wurde 1994 von Beckman Instruments für die Routineanalytik auf den Markt gebracht. Während diese beiden Methoden bisher nicht



**Abbildung 4** Bestimmung von Lipoprotein(a) in 6 Proben mit hohen Triglyceridkonzentrationen (> 3,75 mmol/l). Die Proben wurden auf Triglyceridwerte im Bereich von 3,75-5,75 mmol/l bzw. 3,45-8,05 mmol/l verdünnt und anschließend die Lipoprotein(a) Konzentrationen bestimmt.

miteinander verglichen wurden, liegen Untersuchungen mit anderen Tests vor [20].

Die Korrelationsberechnungen der hier untersuchten kinetischen Nephelometrie mit dem IRMA liefern zufriedenstellende Ergebnisse ( $r = 0,971$  und  $r_s = 0,985$ ,  $n = 182$ ), verglichen mit Literaturwerten über Turbidimetrie ( $r = 0,949$ ,  $n = 21$ ), ELISA ( $r = 0,948$ ,  $n = 21$ ) oder Immundiffusion ( $r = 0,959$ ,  $n = 21$ ) [20].

Die Ergebnisse für die tiefgefrorenen Proben bei kurzer Lagerungsdauer sind besser als vergleichbare Literaturwerte. Der Korrelationskoeffizient - hier  $r = 0,971$  - beträgt bei Rückgauer [20] bei den drei o.g. Methoden  $r = 0,60$ ;  $r = 0,62$  und  $r = 0,82$ .

Die Arbeiten zur Stabilität von Lp(a) über einen längeren Zeitraum ergaben bisher unterschiedliche Ergebnisse [18, 24]. Kronenberg et al. [18] untersuchten den Einfluß des mehrfachen Einfrierens und der Langzeitlagerung bei tiefen Temperaturen bis zu 24 Monate. Dabei konnten sie feststellen, daß sich das erstmalige Einfrieren ungünstig auf die Konzentrationsbestimmung auswirkt und empfehlen für die Bestimmung innerhalb eines Monats die Lagerung bei 4 °C. Die durchschnittliche Reduktion für diesen Zeitraum betrug für Lp(a) 5%. Die hier ermittelten Ergebnisse zur Probenstabilität bei 4 °C über einen Zeitraum von 5 Wochen und für das Einfrieren bei -25 °C decken sich mit den Resultaten von Kronenberg et al., die für Ihre Bestimmungen einen ELISA benutzten. Craig et al. [24] hingegen fanden mit einem Immundiffusionstest und einem ELISA unterschiedliche Reduktionsraten bei allerdings stark unterschiedlichen Mittelwerten für die frisch untersuchten Proben.

Hohe Triglyceridkonzentrationen im Plasma beeinflussen durch Trübung nephelometrische Bestimmungen. Bei der hier eingesetzten kinetischen Nephelometrie wird zusätzlich zur herkömmlichen Nephelometrie

die Reaktionskinetik analysiert, um Störeinflüsse zu minimieren. Der Einfluß der Triglyceridkonzentration (TG) wurde bei 6 Proben untersucht, wobei 3 Proben von 3,45-8,05 mmol/l TG und 3 Proben von 3,45-5,75 mmol/l TG eingesetzt wurden. Dabei konnte bei 4 Proben kein negativer Effekt beobachtet werden, während zwei eine leichte Abnahme von Lp(a) bei steigender Triglyceridkonzentration zeigten. Die Lp(a) Konzentrationen waren in einem Bereich von 100-900 mg/l verteilt.

Die Standardisierung der Lp(a) Bestimmungen ist bisher nicht gelungen. Auch bei den hier verwendeten Kalibratoren bzw. Standardlösungen zeigten sich große Abweichungen, die den methodenunabhängigen Einsatz einschränken. Eine Lösung dieses Problems ist wahrscheinlich nur durch einen häufig geforderten kontrollierten Standard möglich, der zur Zeit zusammen mit einer Referenzmethode für Lp(a) entwickelt wird [22, 23].

Zusammenfassend zeigen die hier durchgeführten Lp(a)-Vergleichsmessungen mit einer immunoradiometrischen Methode und einer kinetischen Nephelometrie eine sehr gute Übereinstimmung, sowohl bei Plasmaproben, die bei 4 °C gelagert wurden, als auch bei eingefrorenen Proben mit kurzer Lagerungsdauer. Die Triglyceridkonzentration als Störgröße mit einem Grenzwert von 5,75 mmol/l konnte nicht bestätigt werden; bei den hier untersuchten Konzentrationen von 3,45-8,05 mmol/l fanden sich keine Auswirkungen auf die Lp(a)-Bestimmung.

Die Automatisierbarkeit und Schnelligkeit sind die Vorteile der untersuchten kinetischen nephelometrischen Methode für die Konzentrationsbestimmung von Lp(a). Die hier ermittelte Präzision und die gute Korrelation mit der immunoradiometrischen Methode unterstützen den Einsatz in der Routineanalytik.

## Danksagung

Die Autoren danken Frau *Carmen Keller*, Frau *Nicole Bouillon* und Frau *Daniela Wittmann* für die Durchführung der Bestimmungen.

## Literatur

1. Assmann G, Schulte H, Eckardstein A. Hypertriglyceridemia and elevated lipoprotein(a) are risk factors for major coronary events in middle-aged men. *Am J Cardiol* 1996; 77:1179-84.
2. Djurovic S, Berg K. Epidemiology of Lp(a) lipoprotein: its role in atherosclerotic/thrombotic disease. *Clin Genet* 1997; 52: 281-92.
3. Scanu AM, Edelstein C. Learning about the structure and biology of human lipoprotein(a) through dissection by enzymes of the elastase family: facts and speculations. *J Lipid Res* 1997; 38: 2193-2206.
4. Kostner GM, Avogaro P, Cazzolato G, Marth E, Bittolo-Bon G, Qunci GB. Lipoprotein(a) and the risk for myocardial infarction. *Atherosclerosis* 1981; 38:51-61.
5. Nachmann RL. Lipoprotein(a): molecular mischief in the microvasculature. *Circulation* 1997; 96:2485-7.
6. Koschinsky ML, Marcovina SM. Lipoprotein(a): structural implications for pathophysiology. *Int J Clin Lab Res* 1997; 27:14-23.
7. März W, Groß W. Quantification of human serum lipoprotein Lp(a): zone immunoelectrophoresis assay, a new sensitive method as compared to electroimmunoassay. *Clin Chim Acta* 1983;134: 265-79.
8. März W, Siekmeier R, Groß E, Groß W. Determination of lipoprotein(a): enzyme immunoassay and immunoradiometric assay compared. *Clin Chim Acta* 1993; 214:153-63.
9. März W, Siekmeier R, Gross W. Determination of lipoprotein(a): evaluation of three methods. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1993; 31:295-302.
10. Duvic CR, Smith G, Sledge WE, Lee LT, Murray MD, Roheim PS, Gallaher WR, Thompson JJ. Identification of a mouse monoclonal antibody, LHLp-1, specific for human Lp(a). *J Lipid Res* 1985; 26:540-8.
11. Labeur C, Michels G, Bury J, Usher DC, Rosseneu M. Lipoprotein(a) quantified by an enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibodies. *Clin Chem* 1989; 35:1380-4.
12. Dac NV, Mezdour H, Parra HJ, Luc G, Luyeye I, Fruchart JC. A selective bi-site immunoenzymatic procedure for human lipoprotein(a) quantification using monoclonal antibodies against apolipoprotein(a) and apolipoprotein B. *J Lipid Res* 1989; 30:1437-1443.
13. Levine DM, Gordon BR. Lipoprotein(a) levels in patients receiving renal replacement therapy: methodologic issues and clinical implications. *Am J Kidney Dis* 1995; 26:162-9.
14. KeBler A, Schumacher M, Wood WG. Immunoluminometric assay for the quantification of apolipoproteins A-I, B, C-II, Apolipoprotein(a) and Lipoprotein(a). *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994; 32: 127-35.
15. Berg K. Confounding results of Lp(a) measurements with some test kits. *Clin Genet* 1994; 46:57-62.
16. Marcovina SM, Albers JJ, Koschinsky ML, Gaur VP. Effect of the number of Apo(a) kringle IV domains on immunochemical measurements of Lp(a). *Clin Chem* 1995; 41:246-55.
17. Evans RW, Sankey SS, Hauth BA, Sutton-Tyrrell K, Kamboh MI, Kuller LH. Effect of sample storage on quantification of lipoprotein(a) by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Lipids* 1996; 31:1197-1203.
18. Kronenberg F, Lobentanz E-M, König P, Utermann G, Dieplinger H. Effect of sample storage on the measurement of Lp(a), apoB and apoA-IV, total and HDL cholesterol and triglycerides. *J Lipid Res* 1994; 35:1318-28.
19. Siekmeier R, März W, Scharnagel H, Nauck M, Mayer H, Wieland H, Groß W, Seiffert UB. Bestimmung von Lipoprotein(a): Vergleich eines neuen latexverstärkten immunoturbidimetrischen Assay mit einem immunradiometrischen Assay. *J Lab Med* 1996; 20:294-8.
20. Rückgauer M. Evaluierung eines neuen Tests zur Bestimmung von Lipoprotein(a) mittels kinetischer Nephelometrie. *Clin Lab* 1996; 42:853-8.
21. Righetti G, Marchetti C, Marzorati N, Graziani MS. A rate nephelometric method for lipoprotein(a) measurement. *Giorn it chem clin* 1993; 18:91-6.
22. Albers JJ, Marcovina SM. Lp(a) quantification: comparison of methods and strategies for standardization. *Curr Opin Lipidol* 1994; 5:417-21.
23. Tate JR, Rifai N, Berg K, Couderc R, Dati F, Kostner GM, Sakurabayashi I, Steinetz A. International Federation of Clinical Chemistry standardization project for the measurement of lipoprotein(a). Phase I. Evaluation of the analytical performance of lipoprotein(a) assay systems and commercial calibrators. *Clin Chem* 1998; 44: 1629-40.
24. Craig WY, Poulin SE, Forster NR, Neveux LM, Wald NJ, Ledue TB. Effect of sample storage on the assay of lipoprotein(a) by commercially available radial immunodiffusion and enzyme-linked immunosorbent assay kits. *Clin Chem* 1992; 38:550-3.
25. Sachs L. *Angewandte Statistik* (8. Auflage). Berlin (DE): Springer Verlag, 1997.