

**Kertas Asli/Original Articles**

**Kaedah Diagnostik Semasa dan Penggunaan Ujian Titik Penjagaan Pantas (POC)  
Bagi Mendiagnos Hiperkolesterolemia Famili (FH)**  
(Current Diagnostic Techniques and the Use of Rapid Point-of-Care (POC) Testing to  
Diagnose Familial Hypercholesterolemia (FH))

LINA KHIALIDA SAIDI, ZAM ZUREENA MD RANI, SITI AISHAH SILAIMAN, ISMAIL AZIAH, ANIS  
AMIRAH ALIM, SHARIPAH NADZIRAH SYED AHMAD AYOB, DEE CHANG FU,  
AZRUL AZLAN HAMZAH\*, NOR AZIAN ABDUL MURAD\*

ABSTRAK

*Hiperkolesterolemia Famili (FH) ialah penyakit genetik yang diwarisi secara autosomal dominan dan dicirikan melalui peningkatan kepekatan plasma kolesterol lipoprotein berketumpatan rendah (LDL-C) di dalam darah. Pesakit FH yang tidak didiagnosis di peringkat awal dan tidak dirawat boleh meningkatkan risiko penyakit jantung koronari pramatang. Dengan kepesatan teknologi dalam bidang biologi molekul, terdapat pelbagai strategi telah diambil untuk membolehkan diagnosis awal FH dilakukan. Teknik-teknik ini dapat meningkatkan keberkesanan kos dan tempoh masa pengesanan adalah lebih cepat. Kaedah diagnostik semasa yang sedia ada untuk mendiagnosis FH yang melibatkan kriteria skor berasaskan algoritma dan pelbagai kaedah diagnosis molekul seperti kaedah penjujukan generasi kedua (NGS), penjujukan Sanger, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) dan mikroatur melalui hibridisasi DNA akan dibincangkan di dalam ulasan ini. Walau bagaimanapun, ujian genetik molekul ini tidak tersedia secara meluas atas sebab seperti prosedur yang memakan masa, kos yang tinggi dan keperluan kepada kakitangan terlatih. Oleh itu, ulasan ini memberi penekanan kepada penggunaan ujian titik penjagaan pantas (point of care, POC) sebagai pendekatan untuk mendiagnosis FH kerana ketiadaan ujian genetik bagi pemeriksaan rutin di negara yang kekurangan infrastruktur dan kepakaran. Ujian aliran lateral (LFA) telah mendapat perhatian sebagai kaedah diagnostik POC kerana ianya mudah, memerlukan kos yang rendah dan proses yang lebih cepat. Kelebihan ini menjadikan LFA sebagai teknik yang berpotensi dalam menangani beberapa cabaran bagi diagnosis FH khususnya bagi diagnosis awal terhadap keluarga pesakit.*

*Kata kunci: Hiperkolesterolemia famili; kaedah diagnostik; ujian titik penjagaan pantas; ujian genetik; asai aliran lateral*

ABSTRACT

*Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant inherited genetic disease characterized by increased concentrations of low-density lipoprotein (LDL-C) cholesterol in the blood. The risk of premature coronary heart disease in FH patients may increase without early treatment. Advancement in molecular biology techniques has enable early detection and diagnosis of FH. These techniques are cost-effective and have a shorter turnaround time. The current diagnostic tools available for FH diagnosis involving algorithm-based scoring criteria and various molecular diagnosis methods including next-generation sequencing (NGS), Sanger sequencing, Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and DNA hybridisation assay are discussed in this review. However, molecular genetic testing is not widely available due to time-consuming procedures, high cost and requires trained personnel. Thus, this*

review highlights the use of point of care (POC) testing as an approach to diagnose FH, particularly in countries lacking infrastructure and expertise in this field. Lateral flow testing (LFA) has gained attention as a POC diagnostic tool due to its simplicity, low cost and involved simple procedure and settings. The advantages of LFA made this technique a potential tool in addressing challenges in diagnosing FH, particularly for early diagnosis of family members.

*Keywords: Familial hypercholesterolemia; diagnostic tool; point of care; genetic testing; lateral flow assay*

## PENGENALAN

Hiperkolesterolemia Famili (FH) ialah penyakit genetik yang diwarisi secara autosomal dominan dan dicirikan melalui peningkatan kepekatan kolesterol lipoprotein berketumpatan rendah (LDL-C) di dalam darah (Kastelein et al. 2020). Memandangkan FH melibatkan peningkatan LDL-C di dalam darah, pendedahan kepada paras LDL-C yang tinggi sejak lahir membawa kepada pengumpulan deposit kolesterol di bahagian badan, seperti di bahagian retina mata (arkus kornea), bahagian lain badan (xanthelasma) dan pada tendon (xanthoma) (Di Taranto et al. 2020). Jika peningkatan LDL-C dalam darah ini tidak dirawat, pesakit mempunyai risiko yang lebih tinggi untuk menghadapi aterosklerosis pramatang, seterusnya mengakibatkan penyakit jantung koronari (Goldberg et al. 2011). Individu lelaki mempunyai risiko sebanyak 50% pada usia 50 tahun, manakala individu wanita pula mempunyai 30% risiko pada usia 60 tahun untuk berlaku kes koronari sekiranya penyakit FH tidak dikesan dan rawatan segera tidak diberikan (Sturm et al. 2018).

Majoriti kes FH disebabkan oleh mutasi genetik jenis autosomal dominan pada gen reseptor LDL (*LDLR*), gen *apolipoprotein (APOB)*, dan gen *proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9)* (Mcgowan et al. 2019). Mutasi pada gen *LDLR* merupakan jenis mutasi paling tinggi berlaku pada pesakit FH iaitu merangkumi >80% daripada keseluruhan kes FH, diikuti dengan gen *APOB* (9%) dan gen *PCSK9* (1%) (Wang et al. 2016). FH juga boleh berlaku secara autosomal resesif, yang disebabkan oleh mutasi pada gen *low-density lipoprotein receptor adapter protein 1 (LDLRAP1)* (Benito-Vicente et al. 2018) tetapi peratusannya adalah amat rendah. Keterukan penyakit FH bergantung kepada sama ada mutasi mempengaruhi kedua-dua alel yang diwarisi daripada kedua-dua ibubapa atau tidak. Homozigot FH (HoFH) berlaku apabila individu mempunyai mutasi yang sama pada kedua-dua alel. Manakala heterozigot FH (HeFH) adalah apabila individu mempunyai mutasi berbeza yang terletak pada alel berbeza, atau mutasi berbeza pada dua gen yang berbeza (Cao et al. 2018).

Kelaziman HeFH di seluruh dunia adalah lebih tinggi, dengan 1 di dalam 250 kes pada populasi umum (Akiyamen et al. 2017). HoFH sangat jarang berlaku dan kelaziman adalah sebanyak 1 di dalam 1,000,000 kes pada populasi umum (Cuchel et al. 2014). Kadar kelaziman HeFH yang tinggi di seluruh dunia memberikan gambaran bahawa beban FH adalah besar di dalam komuniti. Walau bagaimanapun, kelazimannya adalah berbeza-beza merentas populasi dan ianya berbeza bergantung kepada latar belakang etnik dan kriteria yang digunakan untuk menentukan FH.

Secara amnya, diagnosis FH melibatkan diagnosis klinikal melalui ciri klinikal (arkus kornea, kornea, *xanthelasma*, *xanthoma*), kadar LDL-C, sejarah keluarga menghadapi hiperkolesterolemia dan penyakit kardiovaskular arteriosklerotik pramatang (Mcgowan et al. 2019). Walau bagaimanapun, ujian genetik molekul memberikan pengetahuan yang lebih jelas mengenai gen penyebab FH dan ianya boleh digunakan untuk mengesahkan diagnosis klinikal. Selain itu, perolehan maklumat genetik daripada ujian genetik molekul ini juga boleh mempengaruhi pemilihan terapi, seterusnya membolehkan rawatan kejutuan dilakukan. Ia juga penting bagi prognosis penyakit FH ke atas pesakit.

Rawatan untuk pesakit FH melibatkan ubat penurun kolesterol seperti statin, *ezetimibe*, dan perencat *PCSK9* (Hovingh et al. 2013). Rawatan menggunakan perencat *PCSK9* adalah berkesan untuk individu yang mengalami mutasi pengaktifan fungsi pada gen *PCSK9* (Pećin et al. 2020). Oleh itu, ujian genetik molekul ke atas individu FH adalah langkah yang paling disyorkan bagi kebanyakan kes, bukan sahaja untuk mengesahkan diagnosis tetapi juga bagi memilih rawatan yang bersesuaian. Walau bagaimanapun, ujian genetik molekul tidak tersedia secara meluas atas sebab seperti prosedur yang memakan masa, kos yang sangat tinggi dan keperluan kepada kakitangan terlatih. Oleh itu, pendekatan baharu adalah diperlukan untuk meningkatkan diagnosis FH dengan ciri-ciri yang lebih murah dan mesra pengguna.

Limitasi yang dinyatakan di atas boleh diatasi dengan menyediakan ujian titik penjagaan pantas (POC) spesifik

kepada pengesanan asid nukleik boleh membantu dalam diagnosis molekular FH. POC adalah terma yang digunakan untuk menerangkan berkenaan ujian makmal yang boleh dilakukan oleh kakitangan bukan makmal dan boleh dilakukan di lokasi luar makmal. Walau bagaimanapun, pembangunan POC bagi pengesanan asid nukleik masih memerlukan kepada tiga langkah utama iaitu penyediaan sampel, proses amplifikasi dan akhir sekali pengesanan. Namun, saiz, kos dan kekompleksannya boleh ditambahbaik bagi menyokong kriteria POC. Ujian aliran lateral (LFA) kini semakin dikenali dalam aplikasi diagnostik dan berpotensi untuk digunakan sebagai POC bagi pengesanan asid nukleik kerana kelebihan yang tersendiri. Ini termasuklah mudah, pantas, kos yang lebih rendah dan tidak memerlukan mesin yang kompleks. Oleh sebab itu, ujian ini boleh dilakukan di mana-mana sahaja tanpa memerlukan peralatan makmal yang mahal, dan keputusan juga boleh dianalisis dengan mudah walaupun oleh pengendali tidak biasa dengan prinsip ujian (Rentschler et al. 2021). Ulasan ini membincangkan ujian genetik molekul sebagai kaedah diagnostik untuk mengenalpasti FH dan potensi penggunaan LFA sebagai salah satu kaedah untuk mendiagnos pesakit FH.

## ALGORITMA DIAGNOSTIK KLINIKAL

Pendekatan pertama untuk melakukan diagnosis FH adalah dengan melakukan diagnosis secara klinikal dan/atau dengan menggunakan ujian genetik molekul. Penyebab sekunder kepada hiperkolesterolemia mestilah dikecualikan apabila melakukan diagnosis FH termasuklah penyakit diabetes, hipertiroidisme, penyakit buah pinggang dan penyakit hati (Hovingh et al. 2013) kerana kesemua penyakit ini akan meningkatkan kadar kolesterol di dalam darah. Terdapat beberapa kriteria diagnostik klinikal yang telah dibangunkan dengan menggunakan sistem pemarkahan algoritma untuk mendiagnos FH. Kriteria diagnostik yang paling biasa digunakan ialah kriteria *The US Make Early Diagnosis to Prevent Early Death* (MEDPED), sistem *UK Simon Broome* (SB), dan kriteria *Dutch Lipid Clinic Network* (DLCN). Kriteria SB dan DLCN merangkumi ciri-ciri klinikal, sejarah keluarga, diagnosis molekular dan tahap kolesterol, yang kemudiannya diklasifikasikan kepada diagnosis FH yang pasti berlaku (definite), barangkali berlaku (probable), dan berkemungkinan berlaku (possible) (Hovingh et al. 2013). Bagi kriteria MEDPED pula, ia menggunakan jumlah titik pemisah kolesterol yang berpadanan dengan umur dan sejarah keluarga pesakit (Austin et al. 2004). Walau bagaimanapun, nilai pemisah untuk paras LDL-C adalah berbeza di antara kriteria diagnostik yang disebutkan di atas, namun nilai ramalannya adalah hampir sama secara

umum (Lui et al. 2021). Selain daripada sistem algoritma diagnostik yang disebutkan di atas, baru-baru ini, kaedah diagnostik klinikal baharu iaitu *Simplified Canadian Definition for Familial Hypercholesterolemia* telah dibangunkan untuk diagnosis FH (Ruel et al. 2018). Analisis kesamaan telah dilakukan oleh Ruel et al. pada 5987 individu pada populasi Kanada dan kaedah diagnostik baharu ini menunjukkan persamaan yang kukuh dengan kriteria SB dan DLCN ( $k=0.69$  dan  $0.966$ , masing-masing) (Ruel et al. 2018). Selain daripada itu, Cao et al. juga telah membangunkan *Simplified Chinese Criteria for FH* (SCCFH) dan ia juga menunjukkan persetujuan yang sangat baik dengan kriteria SB dan DLCN ( $k=0.993$  dan  $0.951$ , masing-masing) (Cao et al. 2019). Di United Kingdom, satu algoritma ramalan novel iaitu *Familial Hypercholesterolemia Case Ascertainment Tool* (FAMCAT) telah dibangunkan sebagai alternatif kepada kriteria SB dan DLCN untuk mengenal pasti FH dengan tepat menggunakan sembilan pemboleh ubah diagnostik (Weng et al. 2019; Weng et al. 2015).

## SARINGAN HIPERKOLESTEROLEMIA FAMILI (FH)

Sebaik sahaja seseorang individu didiagnosis dengan FH, kes baharu dapat dikenalpasti dengan menyaring ahli keluarga individu, kerana FH adalah penyakit yang diwarisi secara genetik. Apabila pesakit FH telah dikenalpasti, ujian kolesterol atau ujian genetik, atau kedua-duanya sekali boleh dilakukan untuk kesemua ahli keluarga yang berpotensi mengalami penyakit FH. Kitaran ini akan berulang untuk setiap ahli keluarga yang dikenal pasti dengan FH, lalu mengakibatkan bilangan kes yang lebih besar dapat dikesan (Knowles et al. 2017). Tujuan pemeriksaan ini adalah untuk mendiagnosis individu FH seawal mungkin untuk mengurangkan morbiditi dan kematian akibat CVD dengan pemberian rawatan awal (Ned & Sijbrands 2011). Saringan ahli keluarga ini telah dilihat sebagai satu kaedah yang paling berkesan dalam mengenal pasti kes baharu untuk FH (Ademi et al. 2014) dan ianya disyorkan di dalam garis panduan FH antarabangsa termasuklah *The National Institute for Health and Clinical Excellence* (NICE) di United Kingdom dan *Canadian Guidelines* (Louter et al. 2017).

## DIAGNOSIS GENETIK UNTUK HIPERKOLESTEROLEMIA FAMILI (FH)

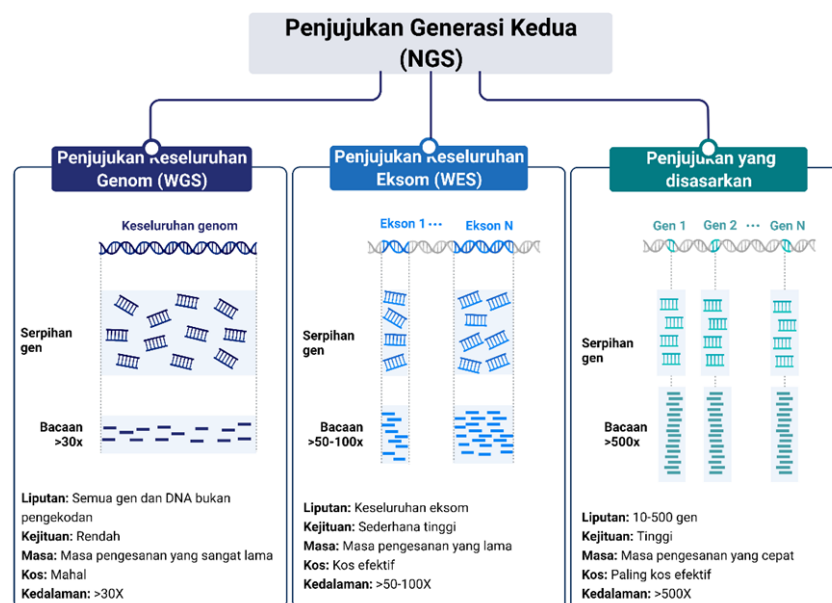
Walaupun terdapat beberapa kriteria diagnostik klinikal telah dibangunkan, ujian genetik molekul untuk FH adalah sangat penting khususnya dalam kes FH yang tidak dapat

ditentukan dengan menggunakan diagnosis secara klinikal sahaja seperti kes pesakit yang mempunyai tahap kolesterol ringan, tanda fizikal yang tidak jelas dan tiada sejarah keluarga menghadapi penyakit arteri koronari pramatang (Fahed & Nemer 2011). Terdapat beberapa kaedah yang boleh digunakan untuk menyaring mutasi penyebab FH.

## PENJUJUKAN GENERASI KEDUA (NEXT-GENERATION SEQUENCING, NGS)

Penjujukan generasi kedua (NGS) telah menjadi kaedah pilihan untuk mendiagnos FH kerana ia menganalisis jujukan gen penuh untuk mengesan bukan sahaja varian yang telah diketahui tetapi juga varian baharu (Vandrovcova et al. 2013). Kaedah ini telah dibangunkan pada akhir 1990-an dan ia dikategorikan sebagai kaedah dengan daya pemrosesan tinggi kerana analisis penjujukan boleh dilakukan secara serentak untuk sejumlah sampel dalam satu masa, seterusnya berupaya meningkatkan daya pengeluaran data (Liu et al. 2012). Penjujukan NGS ini berbeza-beza mengikut platform yang digunakan, tetapi secara amnya, prinsip asasnya melibatkan penyerpihan DNA secara rawak, diikuti dengan proses ligasi kod bar dan amplifikasi, dan seterusnya penjujukan DNA (Rizzo & Buck 2012). Terdapat beberapa jenis teknik bagi NGS iaitu menggunakan platform penjujukan keseluruhan genom (WGS), keseluruhan eksom (WES) atau penjujukan yang disasarkan (Rajah 1). Kos pula berbeza mengikut

platform yang digunakan dan kuantiti gen yang dinilai bersama, dengan anggaran kos untuk satu sampel sebanyak \$3,000-\$10,000 (~RM 10,000-34,000) untuk WGS, \$800-\$1,200 (~RM 2,700-4,100) untuk WES, dan \$300 (~RM 1,000) untuk penjujukan yang disasarkan (Berberich & Hegele 2019). Satu kajian telah dibuat oleh Khera et. al pada tahun 2019 dengan menggunakan kaedah WGS bagi mengesan mutasi yang dikaitkan dengan FH pada 2,081 pesakit yang menghadapi infarksi miokardium peringkat awal pada populasi di Amerika Syarikat. Hasil kajian mereka mendapati bahawa daripada 2,081 pesakit, 36 orang pesakit (1.7%) mempunyai mutasi yang dikaitkan dengan FH yang melibatkan mutasi kehilangan fungsi pada gen *LDLR*, 12 mutasi salah erti yang telah dilaporkan sebagai patogenik di dalam pangkalan data dalam talian *ClinVar* dan juga 16 mutasi novel jenis salah erti yang diramalkan patogenik. Tiada mutasi dikenalpasti pada gen *APOB* dan *PCSK9* (Khera et al. 2019). Ini mengesahkan keberkesanan kaedah WGS dalam mengesan mutasi novel pada gen-gen yang berkaitan dengan FH. Walau bagaimanapun, kelemahan utama WGS dan WES ialah kaedah ini memerlukan pemrosesan data yang meluas, infrastruktur bioinformatik yang lengkap untuk menganalisis dan penyimpanan data, serta isu undang-undang dan etika terhadap penemuan tambahan daripada perolehan keseluruhan data ini (Futema et al. 2012). Bagi kaedah penjujukan yang disasarkan pula, kaedah ini tertumpu kepada pengesanan mutasi dalam kalangan gen yang terlibat dengan sesuatu penyakit. Sebagai contoh, bagi pesakit FH, penjujukan tersasar pada gen *LDLR*, *APOB*,



Templat diadaptasi daripada : Dr. Roshini Abraham  
Pakar Immunologi klinikal di Hospital Kanak-Kanak  
Seluruh Negara

RAJAH 1. Perbezaan pendekatan Penjujukan Generasi Kedua (NGS). NGS terdiri daripada platform penjujukan keseluruhan genom (WGS), penjujukan keseluruhan eksom (WES) dan platform penjujukan yang disasarkan. Rajah dicipta menggunakan perisian BioRender.com

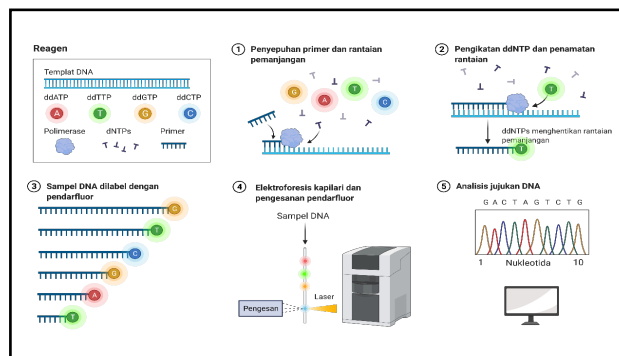


*PCSK9* dan *LDLRAP1* boleh dilakukan. Kelebihan kaedah ini adalah ia lebih tinggi keberkesanan kos berbanding kaedah WES, proses yang lebih cepat dan dapat mengatasi masalah isu etika terhadap penemuan baharu yang tidak berkaitan kerana ianya lebih fokus kepada penyebab mutasi yang dikaitkan dengan gen FH sahaja. Panel NGS yang pertama telah dibangunkan untuk mengesan mutasi pada gen-gen yang dikaitkan dengan FH ialah *LipidSeq* yang dikeluarkan oleh Illumina pada tahun 2013 (Johansen et al. 2014). *LipidSeq* boleh menyaring gen-gen FH seperti *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1* dan juga mengenalpasti polimorfisme nukleotida tunggal (SNP) biasa yang mempunyai kaitan dengan dislipidemia seperti yang telah dilaporkan sebelum ini di dalam kajian GWAS (Johansen et al. 2014). Selepas pembangunan panel *LipidSeq* ini, terdapat beberapa panel NGS yang telah dibangunkan oleh syarikat lain untuk mengesan mutasi pada gen FH khususnya pada gen *LDLR*, *APOB* dan *PCSK9* serta penambahan gen-gen lain yang dikaitkan dengan FH.

## PENJUJUKAN SANGER

Penjujukan Sanger merupakan kaedah generasi pertama bagi teknologi penjujukan DNA. Kaedah ini juga merupakan kaedah yang paling biasa digunakan untuk melakukan diagnosis genetik molekul dan pengesanan mutasi yang dikaitkan dengan FH kerana keupayaannya untuk mengesan perubahan nukleotida tunggal dengan tepat (Ibrahim et al. 2021). Kaedah ini telah dibangunkan oleh Fredrick Sanger pada tahun 1977 dan ia berasaskan prinsip PCR tetapi melibatkan penggunaan primer oligonukleotida tunggal dan nukleotida terubah suai (ddNTP) yang membolehkan penamatan rantaian pemanjangan berlaku kerana ketidakhadiran 3' kumpulan hidroksil pada nukleotida (Sanger et al. 1977) (Rajah 2). Setiap ddNTP akan dilabelkan dengan pewarna pendarfluor tertentu untuk membantu pengesanan. Produk hasil daripada rantaian pemanjangan ini akan dipisahkan berdasarkan saiz menggunakan elektroforesis kapilari dan setiap produk pemanjangan akan melalui pengesan pendarfluor yang akan mengesan lokasi setiap ddNTP dan seterusnya menyusun produk tersebut untuk menghasilkan jujukan individu daripada templat DNA. Dalam satu kajian sebelum ini, Leren telah menggunakan kaedah penjujukan Sanger untuk melakukan jujukan DNA pada gen *PCSK9* pada 51 pesakit FH dalam populasi Norway yang telah didiagnos secara klinikal tetapi tidak mempunyai mutasi pada gen *LDLR* dan *APOB* (Leren 2004). Hasil daripada kajiannya telah menemui dua mutasi novel pada gen *PCSK9* dan seterusnya menjadikan kajian ini adalah kajian yang pertama yang melaporkan tentang gen *PCSK9*

mempunyai kaitan sebagai penyebab mutasi bagi FH. Walau bagaimanapun, kaedah ini tidak boleh digunakan untuk menyaring sejumlah besar pesakit kerana kaedah ini tidak membolehkan analisis penjujukan selari dilakukan dan ianya terhad kepada satu individu dan satu lokasi penjujukan sahaja dalam satu reaksi. Selain itu, kos bagi kaedah ini adalah mengikut saiz produk yang diuji, dengan kos untuk satu reaksi sebanyak ~\$20 USD (~RM88.00) (Berberich & Hegele 2019). Kaedah ini juga tidak dapat mengesan mutasi jenis pemansuhan dan penyisipan besar pada gen *LDLR*, yang juga menyumbang kepada penyebab mutasi kepada FH. Namun, kaedah ini masih lagi digunakan untuk pengesanan varian daripada analisis NGS yang mempunyai liputan teknikal yang rendah atau tidak mencukupi. Selain itu, penyaringan ahli keluarga setelah varian pada kes indeks telah dikenalpasti juga boleh dilakukan dengan menggunakan teknik ini (Iacocca & Hegele 2017).

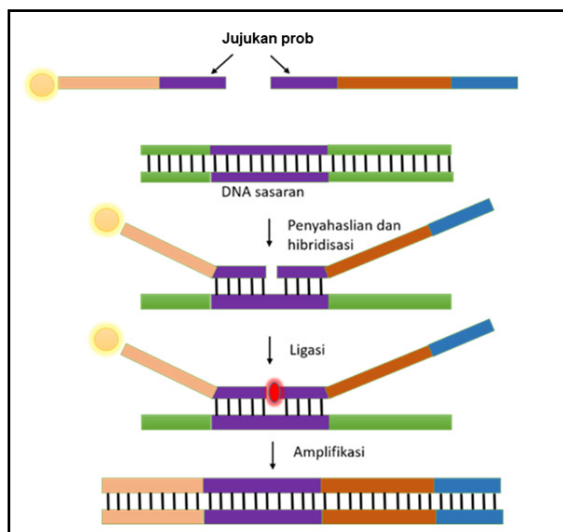


RAJAH 2. Aliran kerja bagi Penjujukan Sanger. Rajah dicipta menggunakan perisian BioRender.com

## MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA)

Kaedah *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) ialah teknologi baharu yang telah dibangunkan pada tahun 2002. Kaedah ini berasaskan prinsip PCR, di mana ia mempergunakan prob yang spesifik kepada jujukan DNA yang diinginkan dan primer universal untuk menilai nombor salinan bagi setiap jujukan DNA tersebut (Stuppia et al. 2012) (Rajah 3). Kaedah MLPA ini berupaya mengesan mutasi pada gen yang mengalami penyusunan semula termasuklah mutasi jenis pemansuhan besar (large deletion), penyisipan besar (large insertion), dan jenis penduaan (duplication) seperti varian salinan nombor (CNV) serta komponen poligenik bagi FH (Hooper et al. 2018). Kaedah ini kebiasaannya dilakukan apabila semua ujian genetik molekul menghasilkan keputusan yang negatif (Moldovan et al. 2020). Kajian yang dilakukan oleh Wang et. al telah mendapati kaedah MLPA berupaya

mengesan mutasi pada pesakit FH yang sebelum ini tidak dikesan mempunyai mutasi pada gen *LDLR* melalui kaedah analisis jujukan ekson melalui ekson (EBESA), dengan kadar pengesanan mutasi FH meningkat daripada 67.6% kepada 86.2% (Wang et al. 2005). Walau bagaimanapun, kelemahan kaedah ini adalah keputusan analisis berkemungkinan menunjukkan keputusan positif palsu. Hal ini kerana, titik mutasi berkemungkinan mengganggu proses hibridisasi dan seterusnya proses amplifikasi dan ligasi lalu menyebabkan kuantiti jujukan yang dikesan adalah kurang daripada bilangan salinan nombor yang sebenar (Iacocca & Hegele 2017). Oleh itu, kaedah MLPA yang menunjukkan keputusan positif mungkin memerlukan kepada ujian pengesanan menggunakan kaedah yang lain. Selain itu, kaedah ini memerlukan latihan dan kepakaran khusus untuk menganalisis keputusan dan kebanyakan makmal tidak akan melabur untuk tujuan itu.

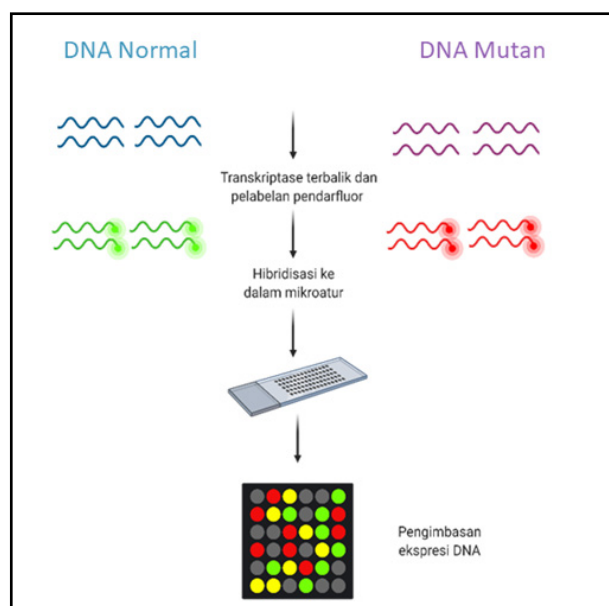


RAJAH 3. Aliran kerja bagi kaedah *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA)

### MIKROATUR MELALUI HIBRIDISASI DNA

Salah satu pendekatan lain untuk melaksanakan ujian genetik molekul FH yang lebih cepat dan mudah ialah dengan menggunakan kaedah mikroatur melalui hibridisasi DNA. Kaedah ini telah direka untuk menguji beberapa penyakit tertentu yang telah diketahui penyebab mutasinya dalam sesuatu populasi (Iacocca & Hegele 2017). Kaedah ini telah dibangunkan pada tahun 1980-an dan berkembang pada akhir 1990-an. Kaedah ini adalah berdasarkan hibridisasi di antara sasaran DNA pelengkap yang berlabel dengan pewarna pendarfluor dan prob spesifik pelengkap

kepada DNA (Govindarajan et al. 2012) (Rajah 4). Beberapa kajian telah menunjukkan keberkesanan kos bagi asai mikroatur DNA ini berbanding kaedah yang lain. Martin et al. telah menggunakan teknologi tatasusunan biocip *Radox* untuk mengesan 40 titik mutasi dalam gen *LDLR*, *APOB* dan *PCSK9* dalam populasi UK dan Ireland (Martin et al. 2016). Teknologi mikroatur ini adalah berdasarkan gabungan PCR multipleks dan hibridisasi tatasusunan biocip. Tatasusunan biocip ini berharga 5 kali ganda rendah daripada kaedah NGS bersama-sama dengan MLPA yang membuktikan keberkesanan kosnya, dan ia juga mempunyai masa pengesanan yang cepat di mana 32 sampel pesakit boleh diproses hanya dalam masa 3 jam (Martin et al. 2016). Selain daripada teknologi tatasusunan biocip *Radox*, terdapat juga teknologi mikroatur lain yang telah dibangunkan iaitu teknologi *Lipochip* dan ia telah digunakan dalam program saringan genetik di Sepanyol pada tahun 2004 untuk menyaring dan mendiagnos pesakit FH (Alonso et al. 2009). Walaupun beberapa kajian telah menunjukkan keberkesanan kos bagi kaedah ini, namun kaedah ini mungkin berkesan untuk mengenal pasti mutasi pada populasi yang dipengaruhi oleh kesan pengasas atau mempunyai bilangan mutasi yang sedikit, namun bagi populasi yang mempunyai kebolehubahan genetik yang tinggi dan mempunyai pelbagai jenis varian mutasi mungkin akan mendapati kaedah ini tidak sesuai (Laurie & George 2009). Tambahan pula, ujian tambahan diperlukan untuk pesakit yang diuji negatif, kerana kemungkinan mutasi pada pesakit tidak termasuk di dalam panel asai seperti mutasi novel (Laurie & George 2009).



RAJAH 4. Aliran kerja bagi kaedah mikroatur melalui hibridisasi DNA. Rajah dicipta menggunakan perisian BioRender.com

## CABARAN DALAM DIAGNOSIS HIPERKOLESTEROLEMIA FAMILI (FH)

Diagnosis FH yang berkesan adalah penting kerana ia boleh memberikan prognosis yang lebih baik dan meningkatkan kecekapan pengurusan penyakit ini melalui perubahan kejituan. Ujian penjujukan DNA merupakan kaedah piawai untuk diagnosis FH kerana ia boleh memberikan diagnosis FH yang muktamad. Terdapat pelbagai kaedah ujian genetik yang tersedia pada masa kini untuk mendiagnos FH tetapi kebanyakan aplikasi bergantung kepada kakitangan terlatih dan memerlukan kemudahan instrumental yang kompleks. Oleh itu, pendekatan lain diperlukan untuk mengatasi limitasi ini dengan menyediakan kaedah ujian titik penjagaan pantas (POC) yang mudah, mesra pengguna, mempunyai tindak balas yang pantas dan kos pembangunan yang rendah.

### PEMBANGUNAN ASAI ALIRAN LATERAL (LFA) SEBAGAI KAEDAH POC

Asai aliran lateral (LFA) ialah satu platform peranti berasaskan fiber nitroselulosa yang berupaya mengesan dan mengkuantifikasi analit sasaran dan keputusan ujian boleh dipaparkan dalam masa 5-30 minit selepas sampel diletakkan di atas peranti asai. Disebabkan oleh kos pembangunan yang rendah dengan anggaran \$0.10-3.00 USD (~RM 0.44-13.00) (Yetisen et al. 2013) untuk satu ujian serta penghasilannya yang mudah, aplikasi LFA telah menunjukkan potensi yang besar dalam POC untuk ujian pantas dan di makmal yang mempunyai kelengkapan minimum.

Perkembangan LFA bermula daripada ujian aglutinasi lateks yang dilakukan oleh Plotz dan Singer pada tahun 1956 (Singer & Plotz 1956), tetapi aplikasinya hanya pertama kali dikomersialkan pada tahun 1980-an untuk diagnosis kehamilan. Kini, ianya digunakan secara meluas untuk ujian kehamilan di rumah. Sejak daripada itu, beberapa ujian pantas lain melibatkan penggunaan LFA telah dibangunkan bagi mendiagnos penyakit-penyakit lain seperti penyakit denggi, malaria, HIV dan yang terbaharu untuk penyakit COVID-19. Ujian berasaskan LFA ini kebiasaannya digunakan untuk pengesanan kualitatif dan kuantitatif antigen dan antibodi tertentu serta produk amplifikasi gen (Koczula & Gallotta 2016). Sampel biologi yang boleh digunakan bagi ujian ini adalah pelbagai termasuklah sampel darah, plasma, air kencing, air liur dan juga peluh.

Secara amnya, perekaan LFA terdiri daripada komponen penting yang melibatkan pemasangan pad sampel, pad konjugat, membran nitroselulosa dan pad penyerapan pada sandaran plastik (Rajah 5). Spesifik bagi

mendiagnos FH, LFA yang direka adalah LFA yang membolehkan pengesanan perubahan nukleotida tunggal pada gen-gen utama yang mengakibatkan FH seperti gen *LDLR*, *APOB* atau *PCSK9*. Pengesanan perubahan nukleotida tunggal tersebut dengan menggunakan LFA boleh dilakukan dengan melakukan modifikasi pada pencetus jujukan yang disasarkan sebelum proses amplifikasi dilakukan. Pencetus kehadapan dan kebelakang akan dimodifikasi dengan menambahkan antigen atau prob yang mempunyai pengikatan affiniti yang tinggi seperti biotin, *digoxigenin* (DIG) dan *carboxyfluorescein* (FAM) (Liu et al. 2017; Liu et al. 2019; Mayran et al. 2022) pada hujung 5' pencetus. Antigen atau prob ini berbeza bagi pencetus kehadapan jujukan DNA normal dan DNA mutan bagi membezakan kedua-dua DNA tersebut. Selepas amplifikasi berlaku, produk amplikon bebenang ganda dua yang berlabel akan dihasilkan dan proses pengesanan boleh dilakukan. Secara umumnya, penggunaan LFA ini memerlukan kepada amplikon PCR diikuti dengan beberapa titik penimbal diletakkan di atas pad sampel. Kemudian, campuran itu mengalir ke arah komponen bersebelahan iaitu pad konjugat dan mengakibatkan konjugat streptavidin-nanozarah emas koloid kering yang berada pada pad konjugat tersebut menambat pada 5'-biotin yang telah dilabelkan pada amplikon PCR. Selepas itu, campuran mengalir ke arah membran nitroselulosa melalui tindakan kapilari di mana amplikon PCR yang berlabel 5' FAM dan 5' DIG menambat pada antibodi tangkapan seperti anti-FAM dan anti-DIG yang berada pada zon ujian untuk membentuk kompleks. Keputusan kehadiran mutasi dapat dilihat dengan kehadiran garis merah pada zon ujian dengan mata kasar kerana pengumpulan konjugat streptavidin-nanozarah emas koloid tersebut. Lebihan streptavidin-nanozarah emas koloid menambat pada biotin yang berada pada zon kawalan lalu menghasilkan garis merah menunjukkan LFA berfungsi dengan baik. Campuran sampel yang berlebihan akan diserap oleh pad penyerapan.

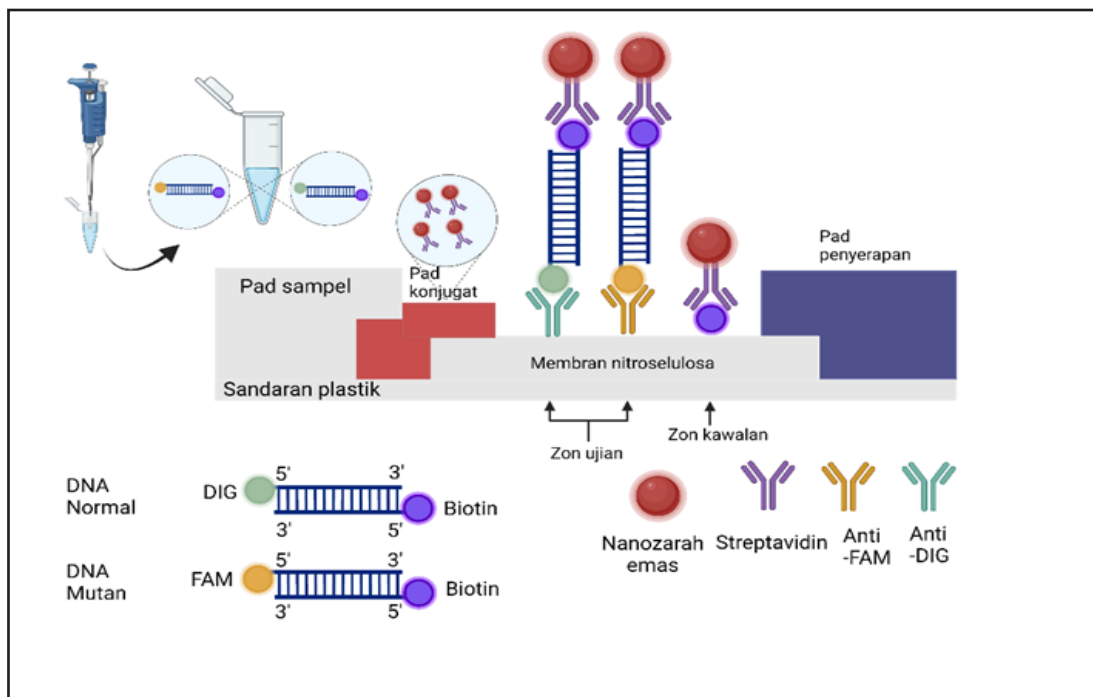
Memandangkan LFA mempunyai beberapa kelebihan dalam mendiagnos penyakit yang menyokong POC, penting untuk ia mempunyai sensitiviti dan spesifisiti yang tinggi untuk meningkatkan prestasi dan keberkesannya. Menurut Yilin Liu, sensitiviti yang tinggi boleh dicapai melalui pengayaan sampel melalui pra-amplifikasi manakala spesifisiti boleh dipertingkatkan melalui asai pengoptimuman dan penggunaan molekul khusus yang mempunyai afiniti yang tinggi. Pengayaan sampel melalui pra-amplifikasi boleh dilakukan menggunakan amplifikasi isoterma dan bukannya kaedah yang paling biasa digunakan iaitu kaedah PCR konvensional yang bersesuaian dengan ciri-ciri POC kerana ia mampu mengamplifikasi asid nukleik pada suhu malar tanpa memerlukan kitaran haba (Liu et al. 2021). Seterusnya, pengikatan spesifik LFA yang

tinggi boleh dicapai dengan menggunakan pengesanan berasaskan aptamer sebagai alternatif kepada teknik pengesanan antibodi kerana aptamer boleh menambat sasaran dengan afiniti dan spesifisiti yang tinggi (Dhiman et al. 2017).

Sehingga kini, terdapat banyak kajian yang telah dilakukan yang menggunakan kaedah asai aliran lateral sebagai kaedah diagnostik untuk mendiagnos penyakit kerana keberkesanan kos dan keputusan ujian dapat diketahui dengan cepat. Ting Lian et. al telah membangunkan *PCR-GoldMag LFA* untuk mengentotip *Apolipoprotein E (ApoE)*, yang merupakan pemalar risiko bagi beberapa penyakit termasuklah penyakit jantung koronari dan penyakit Alzheimer (Lian et al. 2016). Hasil daripada kajian itu menunjukkan asai tersebut berupaya mengesan SNP pada gen *ApoE* dalam masa 1.5 jam dengan julat pengesanan adalah dari 10-1,000 ng DNA. Namun begitu, terdapat beberapa limitasi menggunakan LFA sebagai kaedah diagnostik untuk mendiagnos penyakit dan ia telah dibincangkan dalam beberapa kajian (Posthuma-Trumpie et al. 2009) (Sajid et al. 2015). Antara limitasinya adalah, analisis bagi LFA ini kebanyakannya adalah kualitatif dan semikuantitatif. Selain itu, perlunya diberikan penekanan kepada spesifisiti dan sensitiviti asai dan ia juga bergantung kepada had isipadu sampel yang dibenarkan untuk

pengesanan ujian. Penggunaan isipadu sampel yang tidak tepat akan mengurangkan kejituan asai dan pembatasan isipadu sampel akan menghadkan sensitiviti asai.

Walaupun terdapat beberapa kajian yang telah menggunakan pendekatan LFA sebagai kaedah diagnostik untuk mendiagnos beberapa penyakit, namun, belum ada kajian yang telah membangunkan LFA bagi mendiganos FH spesifik kepada pengesanan mutasi pada gen-gen yang terlibat dengan FH. Ini adalah pendekatan yang baharu dalam mengesan mutasi pada FH yang melibatkan kos yang lebih rendah serta keputusan dapat diperolehi dengan cepat. Pendekatan kaedah LFA sebagai pendekatan baharu dalam mendiganos FH ini diharapkan dapat meningkatkan diagnosis FH dengan cara membolehkan saringan terhadap ahli keluarga yang sudah diketahui mempunyai mutasi pada gen FH. Walau bagaimanapun, ini memerlukan seseorang pesakit yang telah disahkan mempunyai mutasi patogenik melalui ujian genetik. Selain itu, mutasi utama yang mendominasi FH pada kumpulan etnik berbeza perlu diketahui terlebih dahulu sebelum teknik LFA dapat dilakukan dengan lebih meluas. Pengesanan awal ini diharapkan dapat mengurangkan kadar kematian dan morbiditi penyakit jantung koronari dengan pemberian rawatan awal kepada pesakit FH.



RAJAH 5. Pembinaan asai aliran lateral (LFA). Rajah dicipta menggunakan perisian BioRender.com



## KESIMPULAN

Terdapat beberapa ujian genetik molekul yang telah dibangunkan sebagai langkah pengesanan awal bagi penyakit FH. Pengesanan awal ini sangat penting untuk memastikan rawatan awal dapat diberikan dengan segera bagi mengurangkan risiko menghadapi penyakit jantung koronari pramatang pada pesakit FH. Kaedah diagnostik semasa yang digunakan buat masa kini melibatkan ujian genetik seperti penjujukan yang disasarkan bagi gen-gen utama yang dikaitkan dengan FH iaitu gen *LDLR*, *APOB* dan *PCSK9*. Selain itu, kaedah penjujukan Sanger juga masih lagi digunakan sehingga kini khususnya bagi menyaring ahli keluarga yang telah dikenalpasti mempunyai FH. Namun begitu, bagi negara yang kekurangan infrastruktur dan kepakaran, ujian genetik bukanlah pemeriksaan rutin bagi mendiagnos pesakit FH dan akan bergantung kepada diagnosis secara klinikal sahaja. Pendekatan baharu yang menyokong POC seperti LFA dapat mengatasi limitasi ini dan ia berpotensi digunakan sebagai kaedah diagnostik untuk mengesan penyebab mutasi bagi FH dengan kelebihannya yang mesra pengguna, mudah, mempunyai tindak balas yang pantas dan kos pembangunan yang rendah. Pembangunan LFA ini diharapkan dapat membantu meningkatkan pengesanan awal penyakit FH seterusnya membolehkan rawatan kejituan dilakukan terhadap pesakit FH pada masa hadapan.

## PENGHARGAAN

Manuskrip ini di bawah tajaan Geran Penyelidikan Universiti (GUP 2019-069). Beberapa rajah di dalam manuskrip ini telah dihasilkan dengan menggunakan perisian BioRender (<https://biorender.com/>) melalui akaun yang berlesen.

## RUJUKAN

- Ademi, Z., Watts, G. F., Pang, J., Sijbrands, E. J., Van Bockxmeer, F. M., O'leary, P., Geelhoed, E. & Liew, D. 2014. Cascade screening based on genetic testing is cost-effective: evidence for the implementation of models of care for familial hypercholesterolemia. *Journal of Clinical Lipidology* 8(4): 390-400.
- Akiyamen, L. E., Genest, J., Shan, S. D., Reel, R. L., Albaum, J. M., Chu, A. & Tu, J. V. 2017. Estimating the prevalence of heterozygous familial hypercholesterolaemia: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 7(9): e016461.
- Alonso, R., Defesche, J. C., Tejedor, D., Castillo, S., Stef, M., Mata, N., Gomez-Enterria, P., Martinez-Faedo, C., Forga, L. & Mata, P. 2009. Genetic diagnosis of familial hypercholesterolemia using a DNA-array based platform. *Clinical Biochemistry* 42(9): 899-903.
- Austin, M. A., Hutter, C. M., Zimmern, R. L. & Humphries, S. E. 2004. Genetic causes of monogenic heterozygous familial hypercholesterolemia: a huge prevalence review. *American Journal of Epidemiology* 160(5): 407-420.
- Benito-Vicente, A., Uribe, K. B., Jebari, S., Galicia-Garcia, U., Ostolaza, H. & Martin, C. 2018. Familial hypercholesterolemia: the most frequent cholesterol metabolism disorder caused disease. *International Journal of Molecular Sciences* 19(11): 3426.
- Berberich, A. J. & Hegele, R. A. 2019. The role of genetic testing in dyslipidaemia. *Pathology* 51(2): 184-192.
- Cao, Y.-X., Sun, D., Liu, H.-H., Jin, J.-L., Li, S., Guo, Y.-L., Wu, N.-Q., Zhu, C.-G., Gao, Y. & Dong, Q.-T. 2019. A novel modified system of simplified chinese criteria for familial hypercholesterolemia (SCCFH). *Molecular Diagnosis & Therapy* 23(4): 547-553.
- Cao, Y.-X., Wu, N.-Q., Sun, D., Liu, H.-H., Jin, J.-L., Li, S., Guo, Y.-L., Zhu, C.-G., Gao, Y. & Dong, Q.-T. 2018. Application of expanded genetic analysis in the diagnosis of familial hypercholesterolemia in patients with very early-onset coronary artery disease. *Journal of Translational Medicine* 16(1): 1-9.
- Cuchel, M., Bruckert, E., Ginsberg, H. N., Raal, F. J., Santos, R. D., Hegele, R. A., Kuivenhoven, J. A., Nordestgaard, B. G., Descamps, O. S. & Steinhausen-Thiessen, E. 2014. Homozygous familial hypercholesterolaemia: new insights and guidance for clinicians to improve detection and clinical management. a position paper from the consensus panel on familial hypercholesterolaemia of the european atherosclerosis society. *European Heart Journal* 35(32): 2146-2157.
- Dhiman, A., Kalra, P., Bansal, V., Bruno, J. G. & Sharma, T. K. 2017. Aptamer-based point-of-care diagnostic platforms. *Sensors and Actuators B: Chemical* 246: 535-553.
- Di Taranto, M. D., Giacobbe, C. & Fortunato, G. 2020. Familial hypercholesterolemia: a complex genetic disease with variable phenotypes. *European Journal of Medical Genetics* 63(4): 103831.
- Fahed, A. C. & Nemer, G. M. 2011. Familial hypercholesterolemia: the lipids or the genes? *Nutrition & Metabolism* 8(1): 1-12.
- Futema, M., Plagnol, V., Whittall, R. A., Neil, H. a. W. & Humphries, S. E. 2012. Use of targeted exome sequencing as a diagnostic tool for familial hypercholesterolaemia. *Journal of Medical Genetics* 49(10): 644-649.
- Goldberg, A. C., Hopkins, P. N., Toth, P. P., Ballantyne, C. M., Rader, D. J., Robinson, J. G., Daniels, S. R., Gidding, S. S., De Ferranti, S. D. & Ito, M. K. 2011. Familial hypercholesterolemia: screening, diagnosis

- and management of pediatric and adult patients: clinical guidance from the national lipid association expert panel on familial hypercholesterolemia. *Journal of Clinical Lipidology* 5(3): 133-140.
- Govindarajan, R., Duraiyan, J., Kaliyappan, K. & Palanisamy, M. 2012. Microarray and its applications. *Journal of Pharmacy & BioAllied Sciences* 4(Suppl 2): S310-S312.
- Hooper, A. J., Burnett, J. R., Bell, D. A. & Watts, G. F. 2018. The present and the future of genetic testing in familial hypercholesterolemia: opportunities and caveats. *Current Atherosclerosis Reports* 20(6): 1-7.
- Hovingh, G. K., Davidson, M. H., Kastelein, J. J. & O'connor, A. M. 2013. Diagnosis and treatment of familial hypercholesterolaemia. *European Heart Journal* 34(13): 962-971.
- Hovingh, G. K., Davidson, M. H., Kastelein, J. J. P. & O'connor, A. M. 2013. Diagnosis and treatment of familial hypercholesterolaemia. *European Heart Journal* 34(13): 962-971.
- Iacocca, M. A. & Hegele, R. A. 2017. Recent advances in genetic testing for familial hypercholesterolemia. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 17(7): 641-651.
- Ibrahim, S., Defesche, J. C. & Kastelein, J. J. P. 2021. Beyond the usual suspects: expanding on mutations and detection for familial hypercholesterolemia. *Expert Review of Molecular Diagnostics*: 1-9.
- Johansen, C. T., Dubé, J. B., Loyzer, M. N., Macdonald, A., Carter, D. E., Mcintyre, A. D., Cao, H., Wang, J., Robinson, J. F. & Hegele, R. A. 2014. Lipidseq: a next-generation clinical resequencing panel for monogenic dyslipidemias. *Journal of Lipid Research* 55(4): 765-772.
- Kastelein, J. J., Reeskamp, L. F. & Hovingh, G. K. 2020. Familial hypercholesterolemia: the most common monogenic disorder in humans. *American College of Cardiology Foundation Washington DC* 75(20): 9-2567.
- Khera, A. V., Chaffin, M., Zekavat, S. M., Collins, R. L., Roselli, C., Natarajan, P., Lichtman, J. H., D'onofrio, G., Mattered, J., Dreyer, R., Spertus, J. A., Taylor, K. D., Psaty, B. M., Rich, S. S., Post, W., Gupta, N., Gabriel, S., Lander, E., Ida Chen, Y. D., Talkowski, M. E., Rotter, J. I., Krumholz, H. M. & Kathiresan, S. 2019. Whole-genome sequencing to characterize monogenic and polygenic contributions in patients hospitalized with early-onset myocardial infarction. *Circulation* 139(13): 1593-1602.
- Knowles, J. W., Rader, D. J. & Khoury, M. J. 2017. Cascade screening for familial hypercholesterolemia and the use of genetic testing. *JAMA* 318(4): 381-382.
- Koczula, K. & Gallotta, A. 2016. Lateral flow assays. *Essays in Biochemistry* 60(1): 111-120.
- Laurie, A. D. & George, P. M. 2009. Evaluation of high-resolution melting analysis for screening the ldl receptor gene. *Clinical Biochemistry* 42(6): 528-535.
- Leren, T. 2004. Mutations in the PCSK9 gene in Norwegian subjects with autosomal dominant hypercholesterolemia. *Clinical Genetics* 65(5): 419-422.
- Lian, T., Hui, W., Li, X., Zhang, C., Zhu, J., Li, R., Wan, Y. & Cui, Y. 2016. Apolipoprotein E genotyping using PCR-goldmag lateral flow assay and its clinical applications. *Molecular Medicine Reports* 14(5): 4153-4161.
- Liu, H.-B., Zang, Y.-X., Du, X.-J., Li, P. & Wang, S. 2017. Development of an isothermal amplification-based assay for the rapid visual detection of salmonella bacteria. *Journal of Dairy Science* 100(9): 7016-7025.
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L. & Law, M. 2012. Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2012: 251364-251364.
- Liu, M.-Z., Han, X.-H., Yao, L.-Q., Zhang, W.-K., Liu, B.-S. & Chen, Z.-L. 2019. Development and application of a simple recombinase polymerase amplification assay for rapid point-of-care detection of feline herpesvirus type 1. *Archives of Virology* 164(1): 195-200.
- Liu, Y., Zhan, L., Qin, Z., Sackrison, J. & Bischof, J. C. 2021. Ultrasensitive and highly specific lateral flow assays for point-of-care diagnosis. *ACS Nano* 15(3): 3593-3611.
- Louter, L., Defesche, J. & Van Lennep, J. R. 2017. Cascade screening for familial hypercholesterolemia: practical consequences. *Atherosclerosis Supplements* 30: 77-85.
- Lui, D. T., Lee, A. C. & Tan, K. C. 2021. Management of familial hypercholesterolemia: current status and future perspectives. *Journal of the Endocrine Society* 5(1): bvaa122.
- Martin, R., Latten, M., Hart, P., Murray, H., Bailie, D. A., Crockard, M., Lamont, J., Fitzgerald, P. & Graham, C. A. 2016. Genetic diagnosis of familial hypercholesterolaemia using a rapid biochip array assay for 40 common LDLR, APOB and PCSK9 mutations. *Atherosclerosis* 254: 8-13.
- Mayran, C., Foulongne, V., Van De Perre, P., Fournier-Wirth, C., Molès, J.-P. & Cantaloube, J.-F. 2022. Rapid diagnostic test for hepatitis b virus viral load based on recombinase polymerase amplification combined with a lateral flow read-out. *Diagnostics* 12(3): 621.
- Mcgowan, M. P., Hosseini Dehkordi, S. H., Moriarty, P. M. & Duell, P. B. 2019. Diagnosis and treatment of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Journal of the American Heart Association* 8(24): e013225.
- Moldovan, V., Banescu, C. & Dobreanu, M. 2020. Molecular diagnosis methods in familial hypercholesterolemia. *Anatolian Journal of Cardiology* 23(3): 120.

- Ned, R. M. & Sijbrands, E. J. 2011. Cascade screening for familial hypercholesterolemia (FH). *PLoS Currents* 3.
- Pećin, I., Hartgers, M. L., Hovingh, G. K., Dent, R. & Reiner, Ž. 2020. Prevention of cardiovascular disease in patients with familial hypercholesterolaemia: the role of PCSK9 inhibitors. *European Journal of Preventive Cardiology* 24(13): 1383-1401.
- Posthuma-Trumpie, G. A., Korf, J. & Van Amerongen, A. 2009. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. a literature survey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393(2): 569-582.
- Rentschler, S., Kaiser, L. & Deigner, H.-P. 2021. Emerging options for the diagnosis of bacterial infections and the characterization of antimicrobial resistance. *International Journal of Molecular Sciences* 22(1): 456.
- Rizzo, J. M. & Buck, M. J. 2012. Key principles and clinical applications of “next-generation” DNA sequencing. *Cancer Prevention Research* 5(7): 887-900.
- Ruel, I., Brisson, D., Aljenedil, S., Awan, Z., Baass, A., Bélanger, A., Bergeron, J., Bewick, D., Brophy, J. M. & Brunham, L. R. 2018. Simplified Canadian definition for familial hypercholesterolemia. *Canadian Journal of Cardiology* 34(9): 1210-1214.
- Sajid, M., Kawde, A.-N. & Daud, M. 2015. Designs, formats and applications of lateral flow assay: a literature review. *Journal of Saudi Chemical Society* 19(6): 689-705.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74(12): 5463-5467.
- Singer, J. M. & Plotz, C. M. 1956. The latex fixation test: i. application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. *The American Journal of Medicine* 21(6): 888-892.
- Stuppia, L., Antonucci, I., Palka, G. & Gatta, V. 2012. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 13(3): 3245-3276.
- Sturm, A. C., Knowles, J. W., Gidding, S. S., Ahmad, Z. S., Ahmed, C. D., Ballantyne, C. M., Baum, S. J., Bourbon, M., Carrié, A. & Cuchel, M. 2018. Clinical genetic testing for familial hypercholesterolemia: jacc scientific expert panel. *Journal of the American College of Cardiology* 72(6): 662-680.
- Vandrovcova, J., Thomas, E. R. A., Atanur, S. S., Norsworthy, P. J., Neuwirth, C., Tan, Y., Kasperaviciute, D., Biggs, J., Game, L., Mueller, M., Soutar, A. K. & Aitman, T. J. 2013. The use of next-generation sequencing in clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Genetics in Medicine* 15(12): 948-957.
- Wang, J., Ban, M. R. & Hegele, R. A. 2005. Multiplex ligation-dependent probe amplification of LDLR enhances molecular diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Journal of Lipid Research* 46(2): 366-372.
- Wang, J., Dron, J. S., Ban, M. R., Robinson, J. F., McIntyre, A. D., Alazzam, M., Zhao, P. J., Dilliot, A. A., Cao, H. & Huff, M. W. 2016. Polygenic versus monogenic causes of hypercholesterolemia ascertained clinically. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 36(12): 2439-2445.
- Weng, S., Kai, J., Akyea, R. & Qureshi, N. 2019. Detection of familial hypercholesterolaemia: external validation of the FAMCAT clinical case-finding algorithm to identify patients in primary care. *The Lancet Public Health* 4(5): e256-e264.
- Weng, S. F., Kai, J., Neil, H. A., Humphries, S. E. & Qureshi, N. 2015. Improving identification of familial hypercholesterolaemia in primary care: derivation and validation of the familial hypercholesterolaemia case ascertainment tool (FAMCAT). *Atherosclerosis* 238(2): 336-343.
- Yetisen, A. K., Akram, M. S. & Lowe, C. R. 2013. Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab Chip* 13(12): 2210-2251.
- Lina Khalida Saidi  
Siti Aisyah Sulaiman  
Nor Azian Abdul Murad  
Institut Biologi Molekul Perubatan UKM (UMBI),  
Universiti Kebangsaan Malaysia, Jalan Yaacob Latiff,  
56000 Cheras, Kuala Lumpur, Malaysia
- Aziah Ismail  
Institut Penyelidikan Perubatan Molekul (INFORMM),  
Universiti Sains Malaysia, 16150 Kubang Kerian,  
Kelantan, Malaysia
- Anis Amirah Alim  
Sharipah Nadzirah Syed Ahmad Ayob  
Dee Chang Fu  
Azrul Azlan Hamzah  
Institut Kejuruteraan Mikro dan Nanoelektronik, Aras  
4, Kompleks Penyelidikan, Universiti Kebangsaan  
Malaysia, 43600, Bangi, Selangor, Malaysia.
- Correspondence: Nor Azian Abdul Murad & Azrul Azlan Hamzah
- Email address: nor\_azian@ppukm.ukm.edu.my  
& azlanhamzah@ukm.edu.my