

Métodos recomendados para la determinación de la concentración de colesterol en suero o plasma y en otros especímenes biológicos

Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular
Comité Científico
Comisión de Lípidos y lipoproteínas^a

Documento F, Fase 3, Versión 2

Preparado por M. Arranz, M. Esteban, M. Palacios

1. Introducción

Desde que en 1872 Salkowski (1) describió la primera reacción de color para el colesterol, han aparecido una gran cantidad de métodos y procedimientos dado el interés clínico de su valoración (2).

Hoy se cuentan por centenares los métodos descritos para la determinación de la concentración de colesterol, algunos de ellos pequeñas modificaciones de otros preexistentes. No se dispone de una clasificación adecuada que los englobe a todos, aunque desde un punto de vista práctico se les suele clasificar en métodos enzimáticos y en métodos no enzimáticos, que otros autores han llamado métodos químicos (2).

El objetivo de este documento es revisar los métodos de determinación del colesterol y recomendar los métodos indicados a distintos niveles: método definitivo, método de referencia y método rutinario.

2. Clasificación

En la tabla I se presenta una clasificación de los métodos basada en la utilización o no de enzimas, en los pasos necesarios para la realización del análisis y en el principio analítico.

2.1. Métodos no enzimáticos

2.1.1. Fundamentos

Se consideran como métodos no enzimáticos aquellos métodos espectrométricos que no utilizan ninguna enzima en el sistema de determinación. Todos ellos se basan en la reacción del colesterol con un ácido fuerte concentrado, formándose unas sustancias coloreadas que son fundamentalmente colestapoliénos (color verde) y sus iones (color rojo) (30). En la tabla II se presentan las reacciones descritas más importantes para la formación de color y el color obtenido.

Prácticamente en todos los procedimientos el ácido acético y el anhídrico acético se utilizan como disolventes y deshidratantes, mientras que el ácido sulfúrico se utiliza como deshidratante y oxidante. En algunos métodos se utilizan sales de hierro(III) para aumentar la reacción de color.

La secuencia de reacciones que tienen lugar en los métodos fundamentales consiste en una deshidratación y oxidación iniciales del colesterol obteniéndose 3,5-colestadieno. Brieskorn y Capuano (37) sugirieron que este primer producto se polimerizaba a bis-colestadieno, si bien los posteriores estudios de Watanabe (38) apoyaban esta hipótesis, fue el propio Brieskorn (39) quien más tarde llegó a la conclusión de que este bis-colestadieno no era el producto principal de la reacción de Liebermann-Burchard. Burke et al. (30) apoyaron esta idea, sugiriendo una secuencia de reacciones de oxidación a partir del 3,5-colestadieno, que difieren según el sistema de reacción adoptado (Liebermann-Burchard o Zak) y que se comentan a continuación:

—Sistema de Liebermann-Burchard.

En este sistema se forma un ion pentaenílico con un máximo de absorción a 620 nm (color verde), que es el intermediario que medimos, si bien no parece ser el producto final de la reacción. La formación de este intermediario tiene un bajo rendimiento en el tiempo que se considera óptimo para la medición espectrométrica del colesterol y esto explica la baja sensibilidad de los métodos que utilizan este sistema al ser comparados con los que utilizan hierro(III). En este sistema, otros esteroides como el 5,7-colestadien-3-ol y el 7-colesten-3- β -ol, producen 2 y 4 veces más color que cantidades equivalentes de colesterol (40).

—Sistema de Zak (Fe(III)).

En este sistema se forma un ion tetraenílico con un máximo de absorción a 536 nm (color rojo). Tras 30 min de reacción, tiempo óptimo para la medición espectrométrica en este sistema, el rendimiento es próximo al 100%, hecho que explica la mayor sensibilidad de los métodos que utilizan este sistema en comparación con los que utilizan el procedimiento de Liebermann-Burchard. Los esteroides 5,7-colestadien-3-ol y 7-colesten-3- β -ol tan sólo producen una tercera parte del color producido por cantidades equivalentes de colesterol. En ausencia de iones hierro(III) u otros iones metálicos, también se formará un color rojo si se calienta la mezcla de reacción entre 80 y 95 °C, como en la reacción de Salkowski (1); si bien la sensibilidad de la reacción es muy inferior a la obtenida con la presencia de hierro(III) en el medio de reacción.

En ambos casos la reacción cromogénica del colesterol da lugar a varios productos con distinta absorptividad. Esto no es deseable en el análisis cuantitativo e indica la necesidad de controlar estrictamente las condiciones en el curso de la reacción.

Se han descrito modificaciones a los métodos de Liebermann-Burchard y de Tschgaev en los que se realiza una lectura final fluorimétrica (41,42).

^aJA Aguilar, M Arranz, P Chacón, M Esteban, F Fabiani, A Giner, JA Gómez (presidente), J Ortolá, M Palacios, J Puzo, C Rubio.

Tabla I. Métodos basados en la espectrometría óptica para la determinación de la concentración de colesterol

Métodos no enzimáticos	
DIRECTOS	
Basados en la reacción de Liebermann-Burchard	(3)
Basados en la reacción de Zak	(4,5)
Otros	(6-9)
DE DOS PASOS	
Basados en la reacción de Liebermann-Burchard	(10,11)
Basados en la reacción de Zak	(12,13)
DE TRES PASOS	
Basados en la reacción de Liebermann-Burchard	(14-16)
Basados en la reacción de Zak	(17)
DE CUATRO PASOS	
Basados en la reacción de Liebermann-Burchard	(18-19)
Basados en la reacción de Zak	(20)
Otros	(21)
Métodos enzimáticos	
Basados en la determinación de colest-4-en-3-ona	(22)
Basados en la determinación de peróxido de hidrógeno.	
Por métodos no enzimáticos	(23,24)
Por medio de enzimas auxiliares	(25-29)

2.1.2. Manipulaciones del espécimen

Otro aspecto fundamental en el que varían los métodos no enzimáticos empleados para la determinación de colesterol, es la manipulación del espécimen antes del inicio de la reacción de color. Con ello se trata de evitar las interferencias que la bilirrubina y otras sustancias pueden producir en dicha reacción y el distinto rendimiento en la formación de color por parte del colesterol y de sus ésteres.

Las manipulaciones comúnmente utilizadas son: a) extracción, b) saponificación y c) precipitación.

a) Extracción

La extracción pretende eliminar las proteínas del medio de reacción. Puede realizarse mediante dos mecanismos:

—Precipitar las proteínas con sustancias que permitan al mismo tiempo la separación del colesterol de las mismas.

—Mediante el uso de ciertos disolventes o mezclas de disolventes orgánicos que disocian el complejo lípido-proteína, disolviendo los lípidos en la fase orgánica y precipitando las proteínas.

En el caso de utilizar disolventes orgánicos, la reacción posterior puede realizarse directamente con el extracto (43) o bien con el residuo obtenido tras la evaporación del disolvente (14). Los disolventes más utilizados son: etanol: éter;

acetona, anhídrido acético: dioxano; anhídrido acético y 2-propanol (que permite la adición del reactivo de Fe(III)-ácido sulfúrico directamente sobre el extracto).

b) Saponificación

La saponificación produce la hidrólisis de los ésteres del colesterol, y así todo el colesterol pasa a la forma no esterificada. Las razones que han aconsejado la inclusión de este paso en algunos de los métodos son:

—La diferente cromogenicidad del colesterol y de sus ésteres en algunos medios de reacción.

—La posibilidad de que la extracción de los ésteres de colesterol no sea completa según el disolvente seleccionado.

—Si se utiliza un paso de precipitación para la purificación del colesterol, los precipitantes comúnmente utilizados tan sólo precipitan al colesterol no esterificado.

c) Precipitación

La precipitación pretende aislar el colesterol como un complejo insoluble tras su reacción con la digitonina (18), que es el precipitante más ampliamente usado, o con la tomatina (44). La digitonina reacciona con los esteroides que tienen un grupo 3-hidroxilo libre. Este hecho ha sido utilizado para la precipitación selectiva del colesterol no esterificado y para el aislamiento de todo el colesterol tras la saponificación de sus ésteres. Una vez aislado el colesterol como digitonido, será necesario disociar el complejo y eliminar la digitonina, para evitar las interferencias que puede producir en algunos medios de reacción. Aparte de la separación del colesterol y de sus ésteres, este paso permite eliminar los cromógenos no específicos antes del desarrollo de la reacción cromogénica.

2.1.3. Clasificación

Los métodos no enzimáticos, según el número de pasos previos a la reacción cromogénica del colesterol, se pueden clasificar en:

2.1.3.1. Directos (3-9)

En los métodos directos no se realizan los pasos anteriormente descritos, de manera que la reacción cromogénica se realiza directamente con el suero o el plasma. Están sujetos a importantes errores tanto por la presencia de proteínas, que pueden producir una cierta variedad de productos coloreados, como por la presencia, inconstante y en proporciones variables, de cromógenos no específicos como la bilirrubina. En el caso de utilizar la reacción de Liebermann-Burchard, otra fuente de error es la diferente cromogenicidad del colesterol no esterificado y de sus ésteres.

En estos métodos se han descritos dos tipos de blancos:

a) Sólo se utiliza un blanco de reactivos (3). En este caso se supone que el efecto de un blanco de suero es lo suficientemente pequeño como para que no sea necesario tenerlo en cuenta.

b) Se utiliza un blanco de reactivos y un blanco de cada espécimen. De entre los blancos de suero descritos, los más

Tabla II. Principales reacciones de color empleadas en los métodos no enzimáticos de determinación de la concentración de colesterol

Autor	Reactivos	Color
Lieberman (31)	Anhídrido acético y ácido sulfúrico	Verde
Burchard (32)	Cloroformo, anhídrido acético y ácido sulfúrico	Verde
Pearson et al (33)	Ácido <i>p</i> -toluensulfónico en disolución acética y ácido sulfúrico	Verde
Tschugaev (6)	Cloruro de acetilo y sales de zinc en disolución acética	Rojo
Trinder (34)	Cloruro de acetilo, dicloroetano y ácido sulfúrico	Rojo
Zlatkis et al (5)	Cloruro férrico, ácido acético y ácido sulfúrico	Verde
Brown (35)	Cloruro de acetilo, dicloroetano y ácido perclórico	Rojo
Searcy et al (36)	Sulfato de hierro(II), ácido acético y ácido sulfúrico	Rojo

interesantes son aquellos en que se realiza un cambio del medio de reacción, de manera que el colesterol no reacciona y puede sustraerse el color debido al suero (45). En otros, el cambio del medio de reacción es de tal naturaleza que no permite la reacción del colesterol, pero sí la de las sustancias interferentes, de manera que puede realizarse una corrección tanto estática como dinámica (8).

Las principales ventajas de los procedimientos directos, y que hace que sean de los más utilizados, son su rapidez y simplicidad. La principal desventaja es debida a las posibles interferencias a que están sujetos.

2.1.3.2. Métodos de dos pasos (10-13)

En los métodos de dos pasos se introduce un paso de extracción previo a la reacción cromogénica. Este paso elimina algunas de las sustancias que pueden producir interferencias como son las proteínas. Pero persisten los problemas, por la interferencia de los cromógenos inespecíficos (como la bilirrubina) y por la desigual cromogenicidad del colesterol y de sus ésteres, en el caso de la reacción de Liebermann-Burchard. Por lo que respecta a los blancos, en estos métodos tan sólo suele emplearse un blanco de reactivos.

2.1.3.3. Métodos de tres pasos (14-17)

En los métodos de tres pasos se realiza un paso previo de saponificación, antes de la extracción y el desarrollo de color. Con la saponificación y extracción se consigue que todo el colesterol esté en forma de colesterol libre, evitándose el problema de las diferencias de cromogenicidad. Además se tienden a destruir los cromógenos inespecíficos y eliminar los problemas producidos por las proteínas. Uno de los métodos característicos es el método de Abell (14), que se considera como uno de los métodos de referencia más ampliamente utilizado.

2.1.3.4. Métodos de cuatro pasos (18-21)

En los métodos de cuatro pasos se realizan pasos de saponificación, extracción y precipitación previos a la reacción cromogénica. Son largos y complicados, si bien eliminan virtualmente todas las interferencias que puedan presentarse en la determinación de la concentración de colesterol. De estos métodos, uno de los más importantes es el de Schoenheimer y Sperry (18), también aceptado como método de referencia para la determinación de colesterol de cualquier espécimen biológico.

2.1.4. Conclusión

Para la selección de un método ha de tenerse en cuenta, que a medida que aumenta el número de pasos que se utilicen, disminuye el efecto de las interferencias, que supone un aumento de la exactitud del método. Pero del mismo modo que aumenta su complejidad, aumenta la probabilidad de error, disminuyendo su precisión. Desde un punto de vista práctico, disminuye el número de determinaciones que pueden realizarse en una serie analítica. Todo ello motiva que los métodos más complejos (de tres y cuatro pasos) se reserven como métodos de referencia y se prefiera utilizar cotidianamente los métodos menos complicados.

2.2. Métodos enzimáticos

En los últimos años se ha desarrollado una gran cantidad de métodos enzimáticos para la determinación de la concentración de colesterol. La base de todos estos métodos estriba en la utilización de la enzima colesterol oxidasa (EC 1.1.3.6).

La enzima colesterol oxidasa sólo puede actuar sobre el colesterol no esterificado y por ello, un paso previo indispensable, será la hidrólisis de los ésteres de colesterol. En estos métodos se distinguen tres etapas:

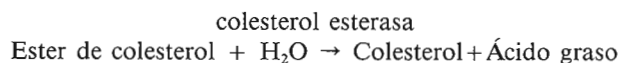
- 1) Hidrólisis de los ésteres de colesterol.
- 2) Acción de la enzima colesterol oxidasa.
- 3) Sistemas de detección.

2.2.1. Hidrólisis de los ésteres de colesterol

Para la hidrólisis de los ésteres de colesterol se distinguen dos tipos de procedimientos, según que empleen o no enzimas:

a) Hidrólisis enzimática

La hidrólisis se realiza mediante la enzima colesterol esterasa (EC 3.1.1.13) que cataliza la siguiente reacción:



Como regla general, los métodos que utilizan este tipo de hidrólisis, realizan las tres etapas de la determinación descritas anteriormente en un solo paso.

Se han descrito numerosas esterases de diverso origen, fundamentalmente microbiano y pancreático. Ambos tipos de enzimas difieren en algunas características de gran importancia en la aplicación analítica, como son: su estabilidad, su activación por sales biliares y su especificidad de sustrato.

Deacon y Dawson (46) en sus estudios concluyeron que la concentración de surfactante en la mezcla de reacción, necesaria para una liberación completa del colesterol de las lipoproteínas, es un factor crítico en la hidrólisis enzimática.

La esterasa de origen pancreático tiene, al contrario que la de origen microbiano, una actividad menor sobre el acetato de colesterol y el araquidonato de colesterol. Aunque en suero humano estos ésteres no son cuantitativamente importantes, pueden encontrarse en diferente proporción en sueros utilizados como calibrados y controles. Esta diferencia de especificidad en el sustrato puede contribuir a la infravaloración detectada en algunos reactivos que utilizan esterases de origen microbiano (47,48).

Además es posible que la accesibilidad al sustrato sea un factor limitante de la hidrólisis completa de los ésteres de colesterol. Siedel et al (49) han descrito un método con una esterasa de origen microbiano (origen no especificado) que en presencia de 3,4-diclorofenol es capaz de llevar a cabo una hidrólisis completa de los ésteres de colesterol en suero.

La esterasa ideal debería hidrolizar completamente los ésteres de colesterol, tanto en sueros de pacientes como en controles y calibradores, en un medio de reacción que contenga concentraciones óptimas de agentes tensoactivos, solución amortiguadora y cationes activadores (50).

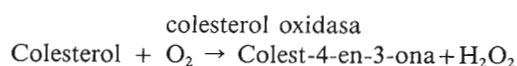
b) Hidrólisis no enzimática

En este procedimiento se realiza inicialmente una hidrólisis alcalina de los ésteres de colesterol del espécimen, seguida de una neutralización del medio de reacción. A partir de aquí las dos siguientes etapas de la determinación se realizan en un solo paso.

Este procedimiento tiene la ventaja que la hidrólisis de los ésteres de colesterol es completa y elimina la interferencia del ácido ascórbico y de la bilirrubina. Sin embargo, son necesarios a continuación diversos pasos para neutralizar el medio y eliminar los grupos tioles interferentes, si se va a utilizar una reacción posterior enzimática a punto final (46).

2.2.2. Acción de la enzima colesterol oxidasa.

Tras la hidrólisis de los ésteres del colesterol, la enzima colesterol oxidasa oxida específicamente el colesterol no esterificado según la siguiente reacción:



La enzima colesterol oxidasa ha sido aislada de los géneros bacterianos: *Nocardia*, *Mycobacterium* y *Brevibacterium*. Richmond (2,51) demostró que la colesterol oxidasa de ciertas especies de *Nocardia* (NCIB 10554) utiliza dioxígeno como aceptor del hidrógeno produciendo 1 mol de peróxido de hidrógeno por cada mol de colesterol oxidado. La enzima es estable, activa en un amplio intervalo de pH (3,5 a 9), termoestable y puede obtenerse fácilmente en las cantidades deseadas. Ninguna de las enzimas de los orígenes mencionados es absolutamente específica del colesterol (3- β -ol- Δ -5-esterol), pero esto no supone interferencias significativas. En suero humano existen otros 3- β -esteroles, pero en cantidades inferiores al 1% del total de esteroides, salvo en los raros casos de betasitosterolemia. Por tanto, las concentraciones de estos potenciales interferentes son insignificantes y la especificidad de la colesterol oxidasa adecuada para la determinación de la concentración de colesterol en suero.

2.2.3. Sistemas de detección

Los diferentes sistemas de detección se basan en la medición de: a) el dioxígeno consumido, b) la colest-4-en-3-ona producida o c) el peróxido de hidrógeno producido en proporciones estequiométricas en la reacción de oxidación enzimática del colesterol. Los sistemas de detección utilizados en cada caso son los siguientes:

a) Medida del dioxígeno consumido

Los métodos electroquímicos utilizan electrodos específicos, con la enzima inmovilizada sobre el propio electrodo de detección. Estos electrodos pueden medir:

—La velocidad de consumo de dioxígeno (52).

—La cantidad de dioxígeno consumido (53).

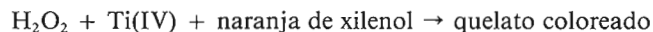
b) Medida de la colest-4-en-3-ona producida

Flegg (22) midió la aparición de colest-4-en-3-ona aprovechando el hecho de que esta sustancia tiene un máximo de absorción de 240 nm y, por lo tanto, el aumento de absorción a esta longitud de onda será proporcional a la concentración de colesterol en el espécimen.

Trinder (54) describió un método en el que la colest-4-en-3-ona es extraída con iso-octano antes de la medición. Este método es específico, pues no interfieren otros esteroides, ni hemoglobina, bilirrubina y ácido ascórbico. Tiene la desventaja de no ser un método automatizable.

c) Medida del peróxido de hidrógeno producido

En general estos métodos utilizan una reacción o secuencia de reacciones acopladas, que toman al peróxido de hidrógeno formado como sustrato para la producción del compuesto que se mide en realidad. Así, Richmond (23) midió la formación de un quelato coloreado entre el titanio(IV) y el naranja de xilenol en presencia de peróxido de hidrógeno:

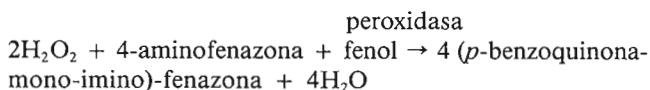


Este indicador de reacción es específico y sin interferencias por la bilirrubina, pero está limitado por el bajo pH de la reacción.

Harders y Helger (24) aprovechan el sistema desarrollado por Ware y Marbach (55) para la determinación de glucosa, en el que el peróxido de hidrógeno formado de la reacción principal, reacciona con yoduro en presencia de un catalizador (molibdato amónico) para producir yodo molecular. La cantidad de yodo molecular producido es proporcional a la concentración inicial de colesterol en el espécimen y aquel se mide espectrométricamente a 360 nm. Este procedimiento también está limitado por el pH de la reacción.

Allain et al (25) utilizan el sistema indicador descrito por Trinder (26), en el que el peróxido de hidrógeno reac-

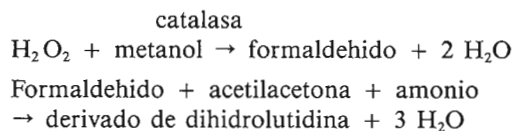
ciona con fenol y 4-aminofenazona en presencia de peroxidasa (EC 1.11.1.7) para formar una quinona coloreada.



Se han desarrollado varias adaptaciones para la automatización de este método (56,57) y este sistema de detección es actualmente el más utilizado de los métodos enzimáticos para la determinación del colesterol. La reacción es rápida, no requiere blanco de suero y, comparando con otros cromógenos tiene una sensibilidad y solubilidad aceptables, además de no inhibir las enzimas colesterol esterasa y colesterol oxidasa. La lista de sustancias que pueden interferir con la medición final acoplada a la peroxidasa incluyen: ácido ascórbico, bilirrubina, triglicéridos, hemólisis y posiblemente sustancias no conocidas.

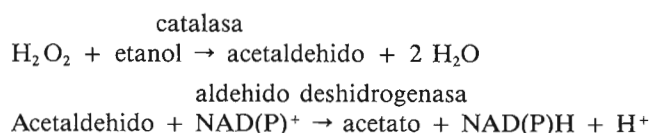
Tarbutton y Gunter (27) utilizan un sistema también con peroxidasa, pero en el que el aceptor de oxígeno es la odianisidina.

Roschlau et al, (28) describen un sistema en el que conjugan una reacción enzimática auxiliar a partir del peróxido de hidrógeno (catalizada con una enzima catalasa) con una reacción indicadora de condensación no enzimática. En el que se forma un derivado de la dihidrolutidina que puede ser cuantificado, tanto espectrométrica como fluorimétricamente. De todas formas, la reacción de condensación no enzimática es lenta y se recomienda el empleo de blanco de suero.



El método es relativamente insensible a interferencias por hemólisis y bilirrubina y se han descrito adaptaciones automatizadas. Está sujeto, sin embargo, a interferencias por el ácido ascórbico y por la turbidez de los especímenes.

Haeckel y Perlick (29) han publicado un método totalmente enzimático que utiliza una reacción auxiliar catalizada por la catalasa y una reacción indicadora catalizada por la aldehído deshidrogenasa. En este sistema se mide la cantidad de NAD(P)H formado a 340 nm:



Huang y Lui Chang (58) describen un procedimiento en el que se realiza una lectura final fluorimétrica de un compuesto altamente fluorescente, producto de la oxidación del ácido homovanílico, catalizado por la peroxidasa.

2.2.4. Resumen

Los métodos enzimáticos han aportado importantes mejoras sobre los métodos no enzimáticos. Las principales ventajas son las relativas a especificidad, precisión y seguridad; ventajas que, junto con su simplicidad y posibilidad de automatización, han hecho que los métodos enzimáticos hayan desplazado a los métodos no enzimáticos en los laboratorios clínicos.

Pero es necesario considerar los factores que pueden afectar potencialmente a la exactitud de la determinación de la concentración de colesterol en los diferentes sistemas de reactivos (2,48,59,60):

—Hidrólisis incompleta de los ésteres del colesterol en los especímenes.

- Interferencia de la turbidez, hemoglobina y bilirrubina.
- Interacción con los detergentes.
- Deterioro de las enzimas.
- Diferente velocidad de reacción en algunos sistemas de los especímenes y de los patrones y controles. La matriz de los materiales de calibración y control puede influir en algunos sistemas de reactivos, habiéndose descrito que los especímenes congelados y liofilizados pueden reaccionar de forma diferente que los especímenes frescos.
- La asignación del valor verdadero en los patrones o calibradores debe hacerse por el método definitivo o de referencia.

3. Métodos recomendados

Los métodos desarrollados para la determinación del colesterol se pueden clasificar en orden jerárquico descendiente de complejidad y exactitud en:

- Método definitivo.
- Método de referencia.
- Método de rutina.

La Comisión de Lípidos y lipoproteínas ha elegido los siguientes métodos, como métodos recomendados por la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular.

3.1. Método definitivo

El método definitivo para un determinado constituyente es aquel que ha sido sometido a una investigación en profundidad y a una evaluación exhaustiva de las fuentes de inexactitud y de inespecificidad (61). Normalmente estos métodos, por su gran complejidad y demanda de alta tecnología, no pueden ser usados habitualmente. El valor medio determinado por el método definitivo se considera como valor «verdadero».

El método aceptado actualmente como definitivo para la determinación de la concentración de colesterol es un método de dilución isotópica y espectrometría de masas desarrollado por el *National Institute of Standards and Technology (NIST, EEUU)* en 1980 (62). En 1986 este método fue parcialmente modificado (63) con resultados equivalentes (64).

El método de dilución isotópica y espectrometría de masas se basa en la adición al espécimen a determinar de una cantidad conocida de colesterol marcado con un isótopo radioactivo y que será utilizado como patrón interno. Después de alcanzado el equilibrio entre el colesterol marcado y el no marcado se procesa el espécimen del siguiente modo:

- 1.— Hidrólisis de los ésteres de colesterol con KOH etanólico y calor, en condiciones óptimas.
- 2.— Extracción del colesterol con hexano.
- 3.— Evaporación del hexano. El residuo seco se trata con bis-(trimetilsilil)-acetamida transformándose en un derivado volátil.
- 4.— Separación de los derivados del colesterol de otros esteroides por cromatografía gas-líquido.
- 5.— Los iones característicos del colesterol y colesterol marcado son seleccionados y detectados por espectrometría de masas.

Se obtiene una excelente separación del colesterol de los interferentes y una alta especificidad en la detección. El proceso incluye además un esquema confirmatorio de la medida, por el que pueden ser detectadas las posibles interferencias.

La concentración de colesterol en el espécimen sérico se calcula a partir del volumen de suero, la cantidad de colesterol marcado añadido y la relación entre el colesterol marcado y el colesterol no marcado encontrado en la medida.

3.2. Método de referencia en suero o plasma

El método de referencia se define como un método cuya precisión y exactitud están suficientemente comprobadas por comparación directa con el método definitivo. Además, deberá haber demostrado ser poco susceptible a las interferencias conocidas (65). Técnicamente es menos dependiente de la alta tecnología, pero no es factible su uso rutinario.

Los métodos rutinarios deben ser validados frente al método de referencia y éste a su vez debe ser validado frente al método definitivo.

Entre los métodos de referencia aceptados como tales actualmente para la determinación de la concentración de colesterol en suero o plasma, en este documento se ha seleccionado un método no enzimático de tres pasos (saponificación, extracción y reacción cromogénica), cuya relativa sencillez permite su uso para la validación de otros métodos más prácticos. El método seleccionado fue inicialmente descrito por Abell et al en 1954 (14) y modificado en 1982 por el *Center for Disease Control* de EEUU (66).

3.2.1. Principio del método

El método consiste en tres pasos consecutivos:

- Saponificación de los ésteres de colesterol con KOH.
- Extracción de todo el colesterol no esterificado con hexano y evaporación del disolvente.
- Desarrollo de color sobre el residuo seco, mediante el sistema de Liebermann-Burchard, con la consiguiente deshidratación y oxidación del colesterol, formándose un ion pentaenílico con un máximo de absorción a 620 nm.

3.2.2. Especimen

La determinación puede realizarse tanto en suero como en plasma, utilizando en éste el EDTA como anticoagulante. Ambos pueden conservarse hasta 1 semana a 4 °C o varios meses a -20 °C (67).

3.2.3. Descripción del método

3.2.3.1. Reactivos

- a) Identificación de los reactivos
 - Etanol absoluto. (Puede utilizarse etanol desnaturalizado con metanol.)
 - Hexano.
 - Ácido acético glacial.
 - H₂SO₄ concentrado.
 - Anhídrido acético exento de HCl
 - KOH 0,36 mol/L: disolver 10 g de KOH grado reactivo en 20 mL de agua.
- b) Preparación de los reactivos y patrones
 - Disolución alcohólica de KOH: disolver 6 mL de la disolución acuosa de KOH 0,36 mol/L en 90 mL de etanol absoluto. Prepárese poco antes de su empleo.
 - Reactivo de Liebermann-Burchard modificado: enfriar 20 volúmenes de anhídrido acético a una temperatura inferior a 10 °C en un frasco con tapón de vidrio. Agregar 1 volumen de H₂SO₄, disolver bien y dejar enfriar durante 9 minutos. Añadir 10 volúmenes de ácido acético, disolver y atemperar a la temperatura ambiente. Utilícese antes de transcurrir 1 hora de su preparación.
 - Patrón de colesterol (10,34 mmol/L): disolver la masa pesada de colesterol (1 g) en el correspondiente volumen de etanol absoluto (250 mL), puede usarse etanol desnaturalizado con metanol. Esta disolución es estable durante varios meses a 4 °C. Si existe alguna duda sobre la pureza del preparado de que se disponga, debe recristalizarse cuatro veces con etanol absoluto y desecarlo luego hasta obtener una masa constante. Más adelante se discutirá con más detalle el problema de la pureza de los patrones de colesterol.

3.2.3.2. Instrumentación

—Espectrómetro capaz de seleccionar una longitud de onda de 620 nm y cubeta de vidrio de 1 cm de paso de luz.

—Baño de agua que pueda mantenerse a una temperatura inferior a 10 °C.

—Baño de agua termostatizado a 50 °C.

3.2.3.3. Procedimiento

1.— Patrón (por duplicado): dispensar 5,0 mL del patrón del colesterol en tubos de centrifuga de 25 mL con tapón de vidrio y añadir 0,3 mL de KOH 0,36 mol/L.

Problemas: dispensar 0,5 mL de cada suero o plasma en tubos de centrifuga de 25 mL de capacidad, con tapón de vidrio. Añadir a cada tubo 5 mL de la disolución alcohólica de KOH, tapar y mezclar.

2.— Incubar los tubos a 50 °C en un baño de agua durante 60 minutos.

3.— Enfriar a la temperatura ambiente. Añadir 10 mL de hexano a cada tubo, tapar y mezclar.

4.— Añadir 5 mL de agua, tapar y agitar vigorosamente durante 15 minutos. Centrifugar a baja velocidad durante 5 minutos.

5.— Patrones: transferir alícuotas de 3 mL de las capas de hexano, equivalentes a 6 mg de colesterol, a sendos tubos de ensayo limpios (aproximadamente de 15 cm de altura y 2 cm de diámetro). Véase nota 1.

Problemas: transferir alícuotas duplicadas de 4 mL de la capa de hexano a tubos de ensayo limpios.

6.— Evaporar el hexano a 60 °C ayudándose de una corriente de aire o de N₂ (véase la nota 2). Enfriar a la temperatura ambiente y tapar con tapones de corcho limpios y secos.

7.— Blanco: tomar un tubo vacío (blanco de reactivo).

8.— Sumergir todos los tubos en un baño de agua a 25 °C. agregar a todos ellos, y a intervalos cronometrados de tiempo, 6 mL del reactivo de Liebermann-Burchard. Tapar, mezclar bien cada tubo y volver a colocar en el baño. Incubar y leer las absorbancias frente al blanco de reactivo a 620 nm en un espectrómetro (véase nota 1), al cabo de exactamente 30 minutos de la adición del reactivo. Los tubos deben mantenerse apartados de cualquier foco luminoso intenso.

9.— Cálculos:

$$\text{Colesterol problema} = \frac{A_x}{A_p} (10,34 \text{ mmol/L} \times \frac{3 \text{ mL}}{4 \text{ mL}}) = \frac{A_x}{A_p} \times 7,76$$

A_x es la absorbancia del problema y A_p es la absorbancia del patrón.

3.2.3.4. Notas

1) Ley de Lambert-Beer. La reacción sigue esta ley fisicoquímica y para la medición debe utilizarse un espectrómetro de elevada resolución. Según Abell et al (14), puede producirse una desviación de la linealidad en algún lote ocasional de reactivos, y esos autores aconsejan determinar 3 patrones, que tengan respectivamente 5,17; 10,34 y 15,51 mmol/L de colesterol, al principio y al final de cada lote de problemas. Sin embargo, en condiciones rutinarias, bastaría con una comprobación inicial con cada nuevo lote de reactivo, preparando una serie de patrones que tuviese 5,17; 10,34, 15,51 y 31,02 mmol/L.

2) Evaporación del éter de petróleo: con aire o N₂. La evaporación en el paso 6 puede acelerarse mediante una corriente de aire en lugar de una corriente de N₂, pero debe comprobarse en tal caso el aire utilizado, comparando patrones desecados con aire y patrones desecados con N₂. Filtrando el aire a través de una columna de CaCl₂ anhidro se obtienen patrones desecados cuyo color es sólo ligeramente menor que el obtenido con patrones desecados con N₂.

3) Pureza de los patrones primarios de colesterol. Radin

(68) describió diversos procedimientos para la recristalización del colesterol y concluyó que el método del dibromuro es el de elección, por cuanto los preparados de colesterol así obtenidos son los que dan una mayor absorbancia en la reacción de Liebermann-Burchard. Williams et al (69) purificaron las preparaciones de colesterol preparadas a partir de 14 proveedores comerciales diferentes por el método del dibromuro y demostraron que las muestras purificadas tenían mayor contenido en colesterol, mayores y más abruptos puntos de fusión, y presentaban simultáneamente los mismos contaminantes que las preparaciones originales. Se ha iniciado un programa de certificación (70) que asegura la reproducibilidad y estabilidad de los patrones de colesterol cristalizados. El *National Institute for Standards and Technology* prepara un patrón de colesterol con una pureza del 99,4%, para utilizarlo en los laboratorios clínicos como «Material Patrón de Referencia SRM 911b». Este producto se fabrica desde 1967, empleándose como material de calibración y como referencia de otros patrones preparados para la determinación de colesterol. Sin embargo, el problema no ha quedado totalmente resuelto, ya que al estudiar tres muestras de estos patrones en 1968 y siete muestras en 1969 (71) se comprobó que dos lotes de una de las preparaciones estudiadas en 1969 contenían sólo el 97% de colesterol y que otras tres muestras contenían productos oxidados. Se aconseja, por tanto, que cada usuario compruebe las preparaciones comerciales frente al patrón de referencia preparado por el *National Institute for Standards and Technology*.

3.2.4. Criterios de fiabilidad del método. Exactitud y precisión

Es prácticamente unánime la coincidencia entre los diversos autores en considerar el método modificado de Abell et al (14) como el más exacto de los que hoy en día existen para la determinación de la concentración de colesterol. En estudios de distribución contracorriente, efectuados por estos autores, se comprobó que el método tenía una especificidad superior al 99%.

La precisión de dicho método, procediendo manualmente, es alta (CV=2%) para concentraciones de colesterol sérico entre 2,6 y 10,4 mmol/L.

La trazabilidad respecto al método definitivo se ha mantenido utilizando un calibrador primario común para ambos (actualmente el SRM 911b) y periódicamente comparando los resultados obtenidos por ambos (72).

Al comparar ambos métodos (64) se observó que el método de referencia tenía una diferencia media relativa de aproximadamente un +1,6% con respecto al método definitivo, cuando se determinaban especímenes séricos; esta diferencia no se observaba si se analizaban muestras purificadas de colesterol. La naturaleza de esta diferencia no ha podido ser bien identificada, aunque a ella pueden contribuir en pequeña proporción distintos precursores y productos oxidados del colesterol. De todas formas debido a que la diferencia es relativamente pequeña y constante, se puede considerar que este método cumple las condiciones para ser considerado método de referencia (73).

3.3. Método de referencia en otros especímenes biológicos

Como método de referencia para la determinación de la concentración de colesterol en cualquier otro espécimen biológico se ha elegido un método no enzimático de cuatro pasos, descrito inicialmente por Schoenheimer y Sperry en 1934 (18) y perfeccionado por Sperry y Webb en 1950 (19).

Empíricamente los métodos de 4 pasos deben ser los más exactos de los métodos no enzimáticos. Sin embargo, es ne-

cesario tomar grandes precauciones para evitar múltiples errores en las manipulaciones.

El protocolo del método esquemáticamente es:

1.— Extracción del colesterol del espécimen con disolventes orgánicos (acetona:etanol), para eliminar proteínas y otras sustancias interferentes.

2.— Saponificación del colesterol esterificado con KOH en medio alcohólico.

3.— Precipitación: el colesterol del extracto se precipita con digitonina en medio ligeramente ácido, durante 16-18 horas a temperatura ambiente. Se forma un complejo insoluble entre la digitonina y el colesterol no esterificado, en proporción estequiométrica 1:1, que implica una purificación y la total eliminación de interferencias.

4.— El precipitado se separa por centrifugación, se lava con acetona:éter y se redissuelve con ácido acético puro en caliente. Finalmente se lleva a cabo la reacción cromogénica con el reactivo de Lieberman-Burchard.

3.4. Método rutinario

La Comisión de Lípidos y lipoproteínas propone como método rutinario (74) un método enzimático directo que, con las precauciones apropiadas, puede proporcionar buenos resultados en la determinación de colesterol. Este método no tiene que ser necesariamente utilizado como método de rutina en los laboratorios clínicos, sino más bien puede servir para comprobar posibles problemas de los sistemas comerciales.

3.4.1. Materiales

- Colesterol esterasa de *Pseudomonas* sp. (E.C. 3.1.1.13)
- Colesterol oxidasa de *Cellulonas* sp. (E.C. 1.1.3.6)
- Triacilglicerol lipasa de *Chromobacterium viscosum* (E.C. 3.1.1.3)
- Peroxidasa de rábano picante (E.C. 1.11.1.7)
- Triton® X-100
- α -ciclodextrina
- 4-aminofenazona
- Ferrocianuro potásico (grado reactivo)
- Sal sódica del ácido 2-hidroxi-3-5-diclorobenceno-sulfónico (HDCBS)
- Colesterol puro: Material SRM 911b.

3.4.2. Reactivos

El reactivo se prepara en solución amortiguadora TRIS-CIH 50 mmol/L pH 7,6 que contiene por litro:

Triton® X-100	0,5 g
4-aminofenazona	1 mmol
HDCBS	2 mmol
α -ciclodextrina	4,1 mmol
Hexacianoferrato (II) de potasio	50 mol
Colesterol esterasa	6,66 μ kat
Colesterol oxidasa	13,3 μ kat
Colesterol peroxidasa	4,9 μ kat
Triacilglicerol lipasa	3333 μ kat

Los calibradores se preparan disolviendo la cantidad adecuada en 2-metoxietanol que contiene 200 g/L Triton® X-100 para obtener una concentración de 20 mmol/L. Se hacen diluciones seriadas en el mismo disolvente para obtener las concentraciones siguientes: 1,25; 2,5; 5,0 y 10 mmol/L. Conservados a 4 °C la estabilidad es por lo menos de 6 meses.

3.4.3. Procedimiento

- Pipetear 1,0 mL de reactivo en tubos apropiados.
- Añadir 3 μ L de espécimen o calibrador.
- Mezclar e incubar a 37 °C durante 12 min

—Medir la absorbancia a 510 nm frente a un blanco de reactivo.

Cálculo: Por análisis de regresión lineal de las absorbancias de los cinco calibradores y el blanco y sus respectivas concentraciones se obtiene la ecuación que permite el cálculo de la concentración de los especímenes.

Alternativamente, se puede utilizar la absorbancia obtenida del calibrador de 5 mmol/L en la siguiente ecuación:

$$\text{Colesterol problema (mmol/L)} = \frac{A_x}{A_p} 5 \text{ mmol/L}$$

El método se puede adaptar a procedimientos automáticos. A_x es la absorbancia del problema y A_p es la absorbancia del patrón.

3.4.4. Características

El coeficiente de variación intraserial debe ser menor del 1,5% y el coeficiente de variación interserial menor del 3%.

La reacción es lineal hasta 23 mmol/L de colesterol con la relación de volúmenes de reactivo y muestra descrito.

Los estudios de interferencias realizadas por el NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) de EEUU muestran que éstas son mínimas para el ascorbato, hemólisis y lipemia.

—Los analizadores que hacen blanco de muestra antes de añadir el reactivo podrían dar resultados erróneamente bajos en especímenes hiperlipémicos, debido a que el reactivo está desarrollado para disminuir la turbidez de los especímenes.

—El ascorbato puede interferir a concentraciones superiores a 170 μ mol/L.

—La bilirrubina puede causar una interferencia negativa de aproximadamente un 6%.

Correspondencia:

Comisión de lípidos y lipoproteínas.
Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular.
C/ Llança 51, bajos. 08015 Barcelona.

Bibliografía

1. Salkowski E. Die reaction des cholesterin mit schwefelsaure. Arch Dtsch Ges Physiol 1872; 6: 207-222.
2. Richmond W. Analytical reviews in clinical biochemistry: the quantitative analysis of cholesterol. Ann Clin Biochem 1992; 29: 577-597.
3. Huang TC, Chen CP, Weffler V, Raftery A. A stable reagent for the Liebermann-Burchard reaction. Anal Chem 1961; 33: 1405-1408.
4. Wybenga DR, Dileggi VJ, Dirstime PH, Di Giorno J. Direct manual determination of serum cholesterol with a single stable reagent. Clin Chem 1970; 16: 980-984.
5. Zlatkis A, Zak B, Boyle AJ. A new method for the direct determination of serum cholesterol. J Lab Clin Med 1953; 41: 486-492.
6. Tschugaev LA. Eine neue colorimetrische reaction des cholesterins. Chem Z 1900; 24: 542-544.
7. Berrouilli ALK. A new method for the colorimetric determination of the cholesterol. Helv Chim Acta 1932; 15: 174-178.
8. Watson P. A simple method for the direct determination of serum cholesterol. Clin Chim Acta 1960; 5: 637-639.
9. Rappaport F, Eichorn F. Sulfosalicylic acid as a substitute for paratoluene sulfonic acid. —A. In the estimation of cholesterol. —B. In the diagnostic test Clin Chim Acta 1960; 5: 161.
10. Bloor WR. The determination of cholesterol in blood. J Biol Chem 1928; 77: 53-61.
11. Sols A. Determinación directa de colesterolina en suero. Rev Esp Fisiol 1947; 111: 225.
12. Jerome H, Fonty P, Vernin H, Leploideur F. Etude d'une methode simplifiée de dosage du cholesterol total et libre dans le serum sanguin par la reaction au chlorure ferrique. Ann Biol Clin 1962; 20: 117.
13. Parekh AC, Jung DH. A new color reaction for cholesterol assay. Clin Chim Acta 1971; 35: 73-78.
14. Abell LL, Levy BB, Brodie BB, Kendall FE. A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. J Biol Chem 1952; 195: 357-366.
15. Traverse PM, Lavergne GH, Depraire R. Problèmes pratiques posés par le dosage du cholesterol total du serum en clinique. Ann Biol Clin 1957; 15: 257.

16. Anderson JT, Keys A. Cholesterol in serum and lipoproteins fractions, its measurement and stability. *Clin Chem* 1956; 2: 145.
17. Mann GV. A method for measurement of cholesterol in blood serum. *Clin Chem* 1961; 7: 275.
18. Schoenheimer R, Sperry WM. A micro method for the determination of free and combined cholesterol. *J Biol Chem* 1934; 106: 97-106.
19. Sperry WM, Webb M. A revision of the Schoenheimer and Sperry method for cholesterol determination. *J Biol Chem* 1950; 187: 97-106.
20. Eskelson CD, Dunn I, Caze CR. Effects of tomatine on the colorimetric determination of cholesterol by the procedure. *Clin Chem* 1967; 13: 468-474.
21. Obermer B, Milton R. The estimation cholesterol in blood. *J Lab Clin Med* 1937; 22: 943.
22. Flegg H. An investigation of the determination of serum cholesterol by an enzymatic method. *Ann Clin Biochem* 1973; 10: 79-84.
23. Richmond W. Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *Nocardia* sp and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clin Chem* 1973; 19: 1350-1356.
24. Harders HD, Helger R. Eine neue indikatorreaktion für die enzymatische cholesterinbestimmung (CHOD-Jodid-Molybdän-Methode). *Lab Med* 1977; 1: 141-146.
25. Allain CC, Poon LS, Chan CSG, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974; 20: 470-475.
26. Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem* 1969; 6: 24-27.
27. Tarbutton PN, Gunter CR. Enzymatic determination of total cholesterol in serum. *Clin Chem* 1974; 20: 724-725.
28. Roschalau P, Bernt E, Gruber W. Enzymatische Bestimmung des gesamt-Cholesterins in serum. *Z Klin Chem Klin Biochem* 1974; 12: 403-407.
29. Haeckel R, Perlick M. A new enzymatic determination of cholesterol. II. The use of aldehyde dehydrogenase to measure H₂O₂ producing reactions. *J Clin Chem Clin Biochem* 1976; 14: 411-414.
30. Burke RW, Diamondstones BI, Velapolid RA, Menis O. Mechanisms of the Liebermann-Burchard reaction. *Clin Chem* 1974; 20: 794-801.
31. Liebermann C. Über des Oxychinoterpen. *Ber Dtsch Chem Ges* 1885; 18: 1803-1809.
32. Burchard H. Deitrage zur Kenntnis des cholesterins. *Chem Zentrabl* 1890; 61: 25-27.
33. Pearson S, Stern S, McGavack TH. A rapid procedure for the determination of serum cholesterol. *J Clin Endocrinol* 1952; 13: 1245-1250.
34. Trinder P. *Analyst* 1952; 77: 321-326.
35. Brown WD. Determination of serum cholesterol with perchloric acid. *Aust J Exp Biol* 1959; 37: 253-257.
36. Searcy RL, Bergquist LM. A new reaction for the quantitations of serum cholesterol. *Clin Chim Acta* 1960; 5: 192-199.
37. Brieskorn CH, Capuano L. Color reaction with triterpenes and sterols. *Chem Ber* 1953; 86: 866-869.
38. Watanabe T. Coloured products and intermediates of Liebermann-Burchard reaction and its mechanisms. *Eiseis Shikenjo Hokoku* 1959; 77: 87.
39. Brieskorn CH, Hoffman H. Beitrag zum chemismus der farbreaktion nach Liebermann-Burchard. *Arch Pharm* 1964; 297: 37-41.
40. Cook RP. Reaction of steroids with acetic anhydride and sulphuric acid (the Liebermann-Burchard test). *Analyst* 1961; 86: 374.
41. Robertson G, Cramp DG. An evaluation of cholesterol determinations in serum and serum lipoprotein fractions by a semi-automated fluorimetric method. *J Clin Pathol* 1970; 23: 243-245.
42. Tishler F, Bathish HN. Fluorimetric method for determination of cholesterol in microliter quantities of blood. *J Pharm Sci* 1965; 54: 1782-1785.
43. Kim E, Godberd M. Serum cholesterol using a stable Liebermann-Burchard reagent. *Clin Chem* 1969; 15: 1171-1179.
44. Kabara JJ, McLaughlin TJ, Riegel CA. Quantitative microdetermination of cholesterol using tomatine as precipitating agent. *Anal Chem* 1961; 33: 305.
45. Richardson RW, Stechell KDR, Woodman DD. An improved procedure for the estimation of serum cholesterol. *Clin Chim Acta* 1971; 31: 403-407.
46. Deacon AC, Dawson PJG. Enzymatic assay of total cholesterol involving chemical or enzymic hydrolysis: a comparison of methods. *Clin Chem* 1979; 25: 976-984.
47. Noel SP, Dupras R, Fillion AM. The activity of cholesterol ester hydrolase in the enzymatic determination of cholesterol: comparison of five enzymes obtained commercially. *Anal Biochem* 1983; 129: 464-471.
48. Wiebe DA, Bernet JT. Influence of incomplete cholesterol ester hydrolysis on enzymatic measurements of cholesterol. *Clin Chem* 1984; 30: 352-356.
49. Siedel J, Haigele EO, Ziegenhorn J, Wahlefeld AW. Reagent for the enzymatic determination of serum total cholesterol with improved lipolytic efficiency. *Clin Chem* 1983; 29: 1075-1080.
50. Demacker PNM, Boerma GJM, Baadenhuyzen H, Van Strik R, Leinjen B, Jansen AP. Evaluation of accuracy of 20 different test kits for the enzymatic determination of cholesterol. *Clin Chem* 1983; 1916-1922.
51. Richmond W. An enzymatic approach to the automated analysis for cholesterol in serum. Tesis doctoral. CNA/MRC Clinical Research Center. University College London. Londres. Gran Bretaña.
52. Kumar A, Christian GD. Enzymatic assay of total cholesterol in serum or plasma by amperometric measurement of rate of oxygen depletion following saponification. *Clin Chim Acta* 1977; 74: 101-106.
53. Noma A, Nakayama K. Polarographic method for rapid microdetermination of cholesterol with cholesterol esterase and cholesterol oxidase. *Clin Chem* 1976; 22: 336-340.
54. Trinder P. Oxidase determination of plasma cholesterol as cholest-4-en-3-one using iso-octane extraction. *Ann Clin Biochem* 1981; 18: 64-70.
55. Ware AG, Marbach EP. Glucose in serum and cerebrospinal fluid by direct application of a glucose oxidase method. *Clin Chem* 1968; 14: 548-554.
56. Wentz PW, Cross RE, Savory J. An integrated approach to lipid profiling: enzymatic determination of cholesterol and triglycerides with a centrifugal analyzer. *Clin Chem* 1976; 22: 188-192.
57. Lie RF, Schmitz JM, Pierre KI, Gochman N. Cholesterol oxidase-based determination by continuous flow analysis, of total and free cholesterol in serum. *Clin Chem* 1976; 22: 1627-1630.
58. Huang H, Lui Chang WK, Guilbault GG. Fluorometric enzymatic determination of total cholesterol in serum. *Clin Chem* 1975; 21: 1605-1608.
59. Naito KH. Reliability of lipid, lipoprotein and apolipoprotein measurements. *Clin Chem* 1988; 34: B84-B94.
60. Wiebe DA, Bernet Jr JT. Influence of incomplete cholesterol ester hydrolysis on enzymic measurements cholesterol. *Clin Chem* 1984; 30: 352-356.
61. Dorsey DB. How does the National Reference System for the clinical Laboratory Standardize results? *Pathologist* 1984; 38: 307.
62. Cohen A, Hertz HS, Mandel J, Paule RC, Schaffer R, Sniegoski LT, Sung T, Welch MJ, White EV. Total serum cholesterol by isotope dilution/mass spectrometry: a candidate definitive method. *Clin Chem* 1980; 26: 854-860.
63. Ellerbe P, Meiselman S, Sniegoski LT, Welch MJ, White E. Determination of serum cholesterol by a modification of the isotope dilution mass spectrometric definitive method. *Anal Chem* 1989; 61: 1718-1723.
64. Ellerbe P, Myers GL, Cooper GR, Hertz HS, Sniegoski LT, Welch MJ, White EV. A comparison of results for cholesterol in human serum obtained by the reference method and by the definitive method of the national reference system for cholesterol. *Clin Chem* 1990; 36: 370-375.
65. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Tentative guidelines for the development of definitive methods in clinical chemistry. NRSCC1-T. Villanova: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1982.
66. Duncan IW, Mather A, Cooper GR. The procedure for the proposed cholesterol reference method. Atlanta: Center for disease control, 1982.
67. Sociedad Española de Química Clínica. Protocolo para la obtención de especímenes en las determinaciones de lípidos y lipoproteínas. *Quim Clin* 1989; 8: 349-351.
68. Radin N. Standard methods in clinical chemistry. Academia Press 1965; 5: 91-92.
69. Williams JH, Kuchmak M, Witter RF. Purity of cholesterol to be used as a primary standard. *J Lipid Res* 1965; 6: 461-465.
70. Copeland BE, Blake WJ, Muelling RJ, Skendzel LP. A report of the standards committee of the College of American Pathologists. National comprehensive laboratory survey 1965, Chemistry section. *Am J Clin Pathol* 1967; 48: 104-126.
71. Williams JH, Kuchmak M, Witter RF. Preparation of hypercholesterolemic and/or hypertriglyceridemic sera for lipid determinations. *Clin Chim Acta* 1970; 28: 247-253.
72. Cooper GR, Smith SJ, Duncan IW y 14 grupos colaboradores. Interlaboratory testing of the transferability of a candidate reference method for total cholesterol in serum. *Clin Chem* 1986; 32: 921-929.
73. Bernet JT, Akins JR, Cooper GR, Poulouse AK, Myers GL, Sampson JE. Factors influencing the accuracy of the National reference system total cholesterol reference method. *Clin Chem* 1991; 37: 2053-2061.
74. Artiss JD, Feldbrugge DH, Kroll MH, McQueen MJ, Pry T, Zak B, Ziegenhorn J. Measurement of cholesterol concentration. En: Methods for Clinical Laboratory Measurement of Lipid and Lipoprotein Risk Factor. Washington: Nader Rifai and G. Russell Warnick, 1991; 33: 50.