

DOCUMENTO

Protocolo para la obtención de especímenes en las determinaciones de lípidos y lipoproteínas

Sociedad Española de Química Clínica, Comité Científico,
Comisión de Lípidos y Lipoproteínas

J.A. Gómez (presidente), J.A. Aguilar, M. Arranz, F. Blanco, M. Buxeda, P. Castro, P. Chacón, M. Esteban, F. Fabiani, A. Galán, A. Giner, A. Grijalba, M. Palacios, J. Puzo, C. Rubio, J.C. Vella

Documento B, Fase 3, Versión 1

La recolección y procesamiento de especímenes constituye el inicio de una serie de procedimientos y manipulaciones complejas para la valoración de los lípidos y lipoproteínas plasmáticos. Las lipoproteínas son partículas frágiles que no toleran condiciones drásticas sin alterar su estructura, debido a su gran tamaño y a las fuerzas relativamente débiles que unen los complejos lípido-proteína. La parte proteica de las mismas, es superficial y relativamente lábil a enzimas proteolíticas y (al igual que su componente lipídico) a determinadas modificaciones químicas. Así, la selección de los conservantes a utilizar y las condiciones de almacenamiento de los especímenes antes de realizar cualquier valoración analítica, dependerán del constituyente y del método analítico que se vaya a utilizar.

Existen además varios factores relacionados con la recogida de especímenes, independientes de las alteraciones patológicas, que pueden influir en las medidas de lípidos y lipoproteínas y que deben ser estrictamente observados para evitar su influencia. Entre ellos cabe incluir: la ingesta de una comida rica en grasas^{1,2}, el ejercicio físico³, las variaciones estacionales^{4,5,6}, y los cambios de la estructura y composición de la sangre tras la extracción⁷⁻¹¹ incluyendo la hemólisis, que puede interferir en algunos de los métodos utilizados para la determinación de lípidos. Por último, los especímenes procedentes de pacientes con diversos tipos de patología pueden contener elementos activos (debido al tratamiento de su enfermedad) que modifiquen el metabolismo de las lipoproteínas *in vivo* o que interfieran sobre la metodología utilizada para la medición de alguno de sus constituyentes (efectos *in vitro*).

Por todo lo anteriormente comentado es importante controlar lo más perfectamente posible los diversos aspectos de la fase preanalítica para poder valorar correctamente los resultados obtenidos de las determinaciones de lípidos y lipoproteínas. En este documento estableceremos unas bases que permitan la estandarización de esta fase, reduciendo al mínimo posible su influencia en la variabilidad de los resultados obtenidos posteriormente. En posteriores documentos se indicarán recomendaciones específicas, en el caso de ser oportunas, para determinaciones concretas.

1. Preparación del paciente

La interpretación de los valores obtenidos requiere el conocimiento de la situación preanalítica del paciente. Cualquier enfermedad reciente, procesos traumáticos, embarazo o ingesta de ciertos tipos de sustancias (como la heparina o anticonceptivos orales) pueden modificar de forma importante las concentraciones séricas (o plasmáticas) de lípidos y lipoproteínas. Por este motivo, los análisis de estos componentes deben postergarse por lo menos tres semanas tras una enfermedad leve, y tres meses tras una enfermedad grave, intervención quirúrgica o traumatismo¹².

Además, el paciente debe ser convenientemente instruido para que tenga en cuenta las siguientes normas: — Debe mantener los hábitos alimentarios y costumbres propias durante los días previos a la obtención del espécimen. Cambios en los hábitos dietéticos pueden inducir modificaciones tanto transitorias como permanentes en

las concentraciones séricas de lípidos y lipoproteínas del individuo analizado.

— Es particularmente importante que el paciente esté sometido a un ayuno previo a la extracción de 12-14 horas, durante el cual puede ingerir agua o la medicación prescrita (ver más adelante). Esta recomendación tiene su origen en los cambios postprandiales¹ de las concentraciones de lipoproteínas plasmáticas (cualitativos y cuantitativos, y no idénticos en individuos sanos o con alteraciones del metabolismo lipoproteico). La «hiperlipemia» alimentaria tiene un curso variable y viene influida por la cantidad y composición de la ingesta, el proceso absorbitivo y el metabolismo individual de los quilomicrones.

— La recogida del espécimen debe ser efectuada utilizando siempre una misma posición, ya que el volumen plasmático cambia con la postura. Estos cambios son debidos a la redistribución del agua extravascular¹³ y pueden llegar a ser del 10% en individuos normales o incluso superiores en pacientes con problemas circulatorios. En pacientes ambulatorios recomendamos realizar la extracción sentados y en los encamados en decúbito.

2. Procesamiento del espécimen

Antes de la valoración analítica del espécimen, se deben tener en cuenta las condiciones de obtención, preparación y conservación del mismo.

2.1. Obtención del espécimen

Se debe realizar por punción venosa en la vena antecubital o en cualquier rama venosa conveniente. Se puede utilizar torniquete, pero a ser posible debe ser retirado antes de iniciar la recogida de sangre a fin de evitar la venostasis. La venostasis prolongada da lugar a una redistribución del agua extravascular¹⁴, con un aumento aparente de la concentración plasmática de las moléculas no difusibles (como las lipoproteínas). De esta manera se minimizan los cambios de concentración de algunos componentes, como el colesterol, cuya concentración aumenta en un 2-5% tras 2 minutos de estasis venosa o incluso más si la interrupción del flujo venoso se prolonga^{15,16}.

2.2. Preparación del espécimen

Para realizar un estudio lipídico o lipoproteico aconsejamos utilizar suero. Para su obtención, debe dejarse coagular la sangre a temperatura ambiente (no superior a 25 °C) durante 45 minutos. Posteriormente, dentro de las 2 horas siguientes a la extracción, y con objeto de separar el suero, se realiza la centrifugación durante 15 minutos a 1500 g en centrífuga refrigerada a 2-4 °C.

Si el espécimen va a ser utilizado para la valoración de lipoproteínas, se debe añadir etilendiaminotetraacetato de sodio (EDTA) a una concentración final de 1,24 mmol/L. La adición de EDTA previene cambios oxidativos en las lipoproteínas, ya que es un quelante de metales pesados tales como el cobre, capaces de promover la autooxidación de ácidos grasos insaturados y colesterol^{17,18}. La oxidación lipídica se asocia con la desnaturación de lipoproteínas, cambios en sus propiedades físicas

y alteraciones en las apolipoproteínas¹⁸⁻²⁰. Por otra parte, la adición de EDTA también retarda cambios en las propiedades físicas y concentración de lipoproteínas inducidos por contaminación del espécimen con bacterias que producen fosfolipasa C, ya que inhibe a esta enzima^{21,22}. En preparaciones de LDL aislada, la actividad proteolítica del suero es responsable de la degradación gradual de apolipoproteínas a 4 °C²³, estos cambios pueden evitarse añadiendo al suero inmediatamente tras su obtención, EDTA y una mezcla antimicrobiana compuesta por azida de sodio, timerosal y cloramfenicol, que inhibe el crecimiento de bacterias aerobias y anaerobias²⁴. El volumen de solución conservadora a añadir debe ser pequeño, para evitar la dilución del espécimen.

2.3. Conservación del espécimen

En general y para que las valoraciones lipídicas se efectúen con la mayor exactitud, es preciso realizar las determinaciones lo antes posible (el mismo día de la obtención del espécimen). No obstante, en determinadas condiciones es necesario acudir a sistemas de conservación, cuya influencia sobre los componentes a valorar dependerá del tipo de compuesto y del método que se vaya a utilizar en su valoración. Con respecto al contenedor, se recomienda el empleo de viales provistos de tapa para evitar las pérdidas debidas a la evaporación.

Cuando sólo se van a realizar determinaciones de colesterol y/o triglicérido, los especímenes se pueden conservar durante unos pocos días (1 semana) refrigerados a 4 °C y durante períodos de tiempo más largos a temperatura de -20 °C o inferiores²⁵.

Los especímenes congelados deben descongelarse antes de efectuar la determinación analítica. El proceso de congelación hace que algunos componentes se concentren en la parte inferior y que el agua del plasma se condense en las paredes interiores y la tapa. Esta falta de uniformidad en los solutos se detecta fácilmente agitando cuidadosamente el tubo colocado frente a una luz, por el movimiento de las líneas de refracción que aparecen entre áreas de alta y baja concentración de soluto. Por esta razón, los especímenes descongelados deben ser agitados cuidadosamente hasta que presenten un aspecto homogéneo.

Cuando se vayan a efectuar determinaciones de lipoproteínas, hay que tener en cuenta que éstas son partículas frágiles que en general no toleran la congelación, liofilización o su almacenamiento en solución durante largos períodos de tiempo sin sufrir cambios que se reflejan en alteraciones de sus características de ultracentrifugación y electroforesis^{26,27}, y en la precipitación con polianiones^{10,28,29}. Por ello, las determinaciones de lipoproteínas deben realizarse lo antes posible.

En algunos casos, dependiendo de la clase de lipoproteína que interese analizar y del método utilizado, pueden ser precisos varios días para completar el proceso analítico. Durante este período de tiempo, el espécimen se almacenará a 4 °C y en la oscuridad. Hay que tener presente que la refrigeración sólo retrasa algunos de los cambios relacionados con el almacenamiento, pero no los detiene completamente. Por esta razón, incluso pocos días de refrigeración pueden originar cambios en la concentración y motilidad electroforética de las lipoproteínas^{10,23,24,28,29}.

Las condiciones de conservación de lipoproteínas du-

rante largos períodos de tiempo no han sido definidas, y no pueden ser generalizadas para todas las lipoproteínas puesto que las condiciones óptimas dependerán del tipo de lipoproteína, de la concentración y estabilidad de la clase de lipoproteína que se desee analizar, del método de separación usado y del procedimiento analítico empleado.

Bibliografía

- Mann J, Truswell AS. Effect of controlled breakfast on serum cholesterol and triglycerides. *Am J Clin Nutr* 1971; 24: 1300.
- Peric-Golia L. Postprandial serum-cholesterol. *Lancet* 1972; ii: 876.
- Wood PD, Haskell WL. The effect of exercise on plasma high-density lipoproteins. *Lipids* 1979; 14: 417-427.
- Fuller JH, Grainger SL, Jarret RJ, Keen H. Possible seasonal variation of plasma lipids in a healthy population. *Clin Chim Acta* 1974; 52: 305-310.
- Warnick GR, Albers JJ. Physiological and analytical variation in cholesterol and triglycerides. *Lipids* 1976; 11: 203-208.
- Van Gent CM, Van Der Voot H, Hessel LW. High-density lipoprotein cholesterol, monthly variation and association with cardiovascular risk factors in 1000 forty year-old Dutch citizens. *Clin Chim Acta* 1978; 88: 152-176.
- Glomset JA, Norum KR. The metabolic role of lecithin: cholesterol acyl-transferase: Perspectives from pathology. *Adv Lipid Res* 1973; 11: 1-65.
- Zilversmit DB, Hughes LB, Balmer J. Stimulation of cholesterol ester exchange by lipoprotein-free rabbit plasma. *Biochim Biophys Acta* 1975; 409: 393-398.
- Chajek T, Fielding CJ. Isolation and characterization of human serum cholesteryl ester transfer protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 3445-3449.
- Bachorik PS, Walker R, Brownell KD, Stunkard AJ, Kwiterovich PO. Determination of HDL-cholesterol levels in stored human plasma samples. *J Lipid Res* 1980; 21: 608-616.
- Wood PD, Bachorik PS, Albers JJ, Stewart CC, Winn C, Lippel K. An investigation of the effects of sample aging on total cholesterol values determined by the automated ferric chloride-sulfuric acid and Lieberman-Burchard procedures. *Clin Chem* 1980; 26: 592-597.
- Lewis B. Lipids, en «Chemical diagnosis of disease» Brown SS, Mitchell FL, Young DS (editores) 1979; Elsevier/North-Holland pp 287.
- Tan MH, Wilmhurst EG, Gleason RE, Soeldner JS. Effect of posture on serum lipids. *N Eng J Med* 1973; 289: 416-419.
- Statland BE, Bokelund H, Winkel P. Factors contributing to intra-individual of serum constituents: 4. Effects of posture and tourniquet application on variation of serum constituents in healthy subjects. 1974; 20: 1513-1519.
- Koerselman HB, Lewis B, Pilkington TRE. The effect of venous occlusion on the level of serum cholesterol. *J Atheroscler Res* 1961; 1: 85-88.
- Page JH, Moinuddin M. The effect of venous occlusion on serum cholesterol and total protein concentration- a warning. *Circulation* 1962; 25: 651-652.
- Nishida J, Kummerow FA. Interaction of serum lipoproteins with hydroperoxide of methyl linoleate. *J Lipid Res* 1960; 1: 450-458.
- Nichols A, Rehnberg CS, Lindgren FT. Gas chromatographic analysis of fatty acids from dialyzed lipoproteins. *J Lipid Res* 1961; 2: 203-207.
- Hatch FT, Lees RS. Practical methods for plasma lipoprotein analysis. *Adv Lipid Res* 1968; 6: 1-68.
- Schuh J, Faircloth GF, Haschemeyer RH. Oxygen mediated heterogeneity apo-low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 3173-3177.
- Schwertner HA, Friedman HS. Changes in lipid values and lipoprotein patterns of serum samples contaminated with bacteria. *Am J Clin Pathol* 1973; 59: 829-835.
- Knoetgen V, Petek W, Kostner G. Alteration of serum lipid values and lipoproteins by bacteria as a possible cause of artifacts in the screening of dyslipoproteinemias. *Klin Wochenschr* 1976; 54: 643-645.
- Krishnaiah KV, Wiegandt H. Demonstration of a protease like activity in human serum low density lipoprotein. *FEBS Lett* 1974; 40: 265-268.
- Chapman MJ, Kane JP. Stability of the apoprotein of human serum low density lipoprotein: Absence of endogenous endopeptidase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1975; 66: 1030-1036.
- Bachorik PS, Albers JJ, Ellefson RD, Kane JP. Collection of blood samples for lipoprotein analysis. *Clin Chem* 1982; 28: 1375-1378.
- Del Gatto L, Nichols AV, Lindgren FT. Effects of freeze-thawing and storage on ultracentrifugal properties of human serum lipoproteins. *Proc Soc Exp Biol Med* 1959; 101: 59-61.
- Mills GL, Wilkinson PA. Some effects of storage on plasma lipoproteins. *Clin Chim Acta* 1962; 7: 685-693.
- Warnick GR, Albers JJ. High density lipoprotein cholesterol (HDL CH) quantitation: Effect of plasma storage on heparin-Mn²⁺ supernatant. *Clin Chem* 1979; 25: 1908.
- Warnick GR, Mayfield C, Albers JJ. Evaluation of quality control materials for high density-lipoprotein cholesterol quantitation. *Clin Chem* 1981; 27: 116-123.