

Recomendaciones para la determinación de la concentración en suero del colesterol de las lipoproteínas de alta densidad

Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular
Comité Científico
Comisión de Lípidos y Lipoproteínas¹

Documento G, Fase 3, Versión 2

Preparado por Mercedes Palacios, Margarita Esteban, José Ángel Aguilar, Juan B. Ortolá

Índice

- 0 Introducción
- 1 Objeto
- 2 Definición
- 3 Métodos de separación y cuantificación del colesterol de las lipoproteínas de alta densidad
- 4 Método de referencia
- 5 Criterios de calidad
- 6 Espécimen y muestra
- 7 Recomendaciones prácticas
- 8 Consideración final
- 9 Bibliografía

0 INTRODUCCIÓN

La relación directa y estrecha entre la concentración de colesterol en suero y el riesgo de presentar enfermedad cardiovascular fue establecida hace décadas. Estudios epidemiológicos posteriores demostraron que existía además una relación inversa entre la concentración sérica del colesterol transportado por las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y el desarrollo de arteriosclerosis: los individuos con concentraciones más bajas de colesterol de las HDL presentan un mayor riesgo de sufrir accidentes cardiovasculares, incluso con concentraciones aceptables de colesterol, que los individuos con concentraciones superiores de estas lipoproteínas (1). Se estima que el aumento de un 1% en las cifras de colesterol de las HDL se asocia a una disminución de un 2 a un 4% del riesgo cardiovascular. Los posibles mecanismos según los cuales las HDL protegen contra el desarrollo de la cardiopatía coronaria están ligados a su función más importante: el transporte reverso del colesterol desde los tejidos hacia el hígado.

El *National Cholesterol Education Program* (2) recomendó recientemente realizar la medida del colesterol de las HDL junto con el colesterol, ya que existen evidencias suficientes para aceptar su papel «causal» en el desarrollo de la aterogénesis, y considerar las concentraciones por debajo de 0,91 mmol/L como factor independiente de riesgo coronario, mientras las concentraciones superiores a 1,55 mmol/L serían protectores.

Por lo tanto, consideramos que la determinación de la concentración sérica de colesterol de las HDL debe realizarse, junto con el colesterol, como parte del perfil lipoproteico utilizado para evaluar el riesgo individual de accidente cardiovascular. La gran importancia clínica que ha adquirido esta magnitud, así como la aplicación de unos valores discriminantes de aplicación universal, han motivado que diferentes Sociedades e Instituciones hayan establecido criterios de calidad y recomendaciones para su cuantificación en los laboratorios clínicos. Esto es importante porque los métodos empleados habitualmente no alcanzan los objetivos analíticos deseables, y aquellos valores discriminantes se establecieron con unos métodos que no pueden realizarse en la práctica cotidiana de los laboratorios clínicos (3).

1 OBJETIVO

El objetivo del presente documento es hacer una revisión sobre los métodos más utilizados de separación de las lipoproteínas de alta densidad y la cuantificación de la concentración del colesterol de las lipoproteínas de alta densidad, y proponer una serie de recomendaciones sobre los mismos, tendentes a disminuir la gran variabilidad analítica y favorecer su estandarización en la práctica asistencial de los laboratorios clínicos.

2 DEFINICIÓN

Las lipoproteínas de alta densidad incluyen una familia compleja y heterogénea de partículas que varían en el tamaño y composición química y que se mantienen en un estado dinámico de interacción con las lipoproteínas de baja (LDL) y muy baja densidad (VLDL). Las HDL contienen en su partícula una mayor proporción (> 50%) de proteínas frente a lípidos que las otras lipoproteínas. Las apolipoproteínas presentes en ellas son las apolipoproteínas A-I (1/3 de la masa total), A-II, C-1, C-II, C-III, E, A-IV y D. Los fosfolípidos son el principal componente lipídico de las HDL (50% del mismo), con menores cantidades de colesterol no esterificado, colesterol esterificado y triglicérido (éstos dos últimos en la zona central de la lipoproteína).

La definición de estas lipoproteínas no es fácil y por ello se hace de acuerdo al método utilizado para su separación. Clásicamente, el colesterol de las HDL se refiere a la fracción de colesterol vehiculizada por las lipoproteínas de alta densidad definidas por ultracentrifugación. En la práctica habitual, sin embargo, los principales componentes de esta fracción son las

¹Composición de la Comisión: J. A. Aguilar, M. Arranz, P. Chacón, M. Esteban, F. Fabiani, A. Giner, J. A. Gómez Gerique, J. B. Ortolá, M. Palacios, J. Puzo (Presidente), C. Vella.

HDL tipo 2 y HDL tipo 3, debido a que estas subclases son las que se separan con los métodos de precipitación más utilizados.

Las HDL se cuantifican en términos de su contenido en colesterol, aunque sólo constituye un sexto de la masa total, debido a la amplia experiencia acumulada con los estudios realizados hasta hoy sobre su asociación con el riesgo cardiovascular.

3 MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL COLESTEROL DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD

Las partículas lipoproteicas pueden ser fraccionadas y separadas entre ellas por diversos métodos según sus diferentes propiedades, antes de proceder a su cuantificación. Debido a que los métodos están basados en principios de medida diferentes los resultados no son intercambiables, tanto en las lipoproteínas aisladas como en las concentraciones de colesterol medidas.

Los diversos métodos disponibles para la separación de las HDL se pueden clasificar según el principio analítico empleado. Los más utilizados en el laboratorio clínico para la separación y posterior cuantificación del colesterol de la familia de las HDL son:

- Métodos electroforéticos
- Métodos de precipitación química
- Métodos de ultracentrifugación
- Métodos combinados

3.1 Métodos electroforéticos

Históricamente las lipoproteínas fueron separadas por estos métodos en base a su tamaño y según la carga de sus apolipoproteínas. Se denominaron lipoproteínas alfa, pre-beta y beta, al comparar su desplazamiento con otras proteínas séricas conocidas: lipoproteínas alfa, pre-beta y beta. Las primeras clasificaciones de las hiperlipemias se hicieron según los diagramas obtenidos con las distintas clases de lipoproteínas separadas con este método (4).

Existen fundamentalmente dos tipos de separaciones electroforéticas: las basadas en soportes no restrictivos como agarosa y acetato de celulosa, y las que utilizan soportes restrictivos como la poliacrilamida y la poliacrilamida-agarosa.

Una vez separadas las lipoproteínas se identifican por:

- su capacidad de captación de un colorante más o menos específico
- precipitación con compuestos polianiónicos
- desarrollo de color de reacciones enzimáticas del colesterol sobre el mismo soporte de electroforesis.
- mediante recuperación de bandas separadas y posterior cuantificación del contenido de colesterol en las mismas.

Estos métodos de separación se han ido abandonado progresivamente debido a su imprecisión e inexactitud. La tinción inespecífica, la incompleta recuperación de las lipoproteínas y la baja sensibilidad (5) hace que sólo puedan ser considerados como métodos semicuantitativos, algo alejado de las necesidades actuales. Pueden quedar reservados para ciertos estudios en los que se desee determinar características cualitativas de las lipoproteínas del paciente, como la disbetalipoproteinemia, y para la descripción clásica de las displipemias.

3.2 Métodos de precipitación química

El principio analítico de estos métodos es aislar las HDL mediante precipitación selectiva de las otras lipoproteínas en un espécimen de suero o plasma, para posteriormente medir el co-

lesterol de las HDL presente en el sobrenadante obtenido tras la separación por centrifugación.

La precipitación se consigue por la interacción de un polianión y un catión divalente, u otras sustancias químicas, con las lipoproteínas que contienen apolipoproteína B -(VLDL, IDL, LDL y lipoproteína (a)- para formar unos complejos insolubles con tendencia a sedimentar y que luego se separan por centrifugación a baja velocidad. De esta manera, si la precipitación de las lipoproteínas con apolipoproteína B es completa y no precipita HDL, se puede considerar que sólo las HDL permanecen en el sobrenadante. Hay que considerar que, en presencia de concentraciones elevadas de lipoproteínas ricas en triglicérido, los complejos formados pueden permanecer en suspensión o flotación. Por otra parte, en función del método y de las condiciones de precipitación, otras proteínas pueden coprecipitar con las lipoproteínas con apolipoproteína B (6).

Este grupo de métodos actualmente es el más utilizado para la determinación habitual del colesterol de las HDL por la relativa simplicidad, tiempo de realización, costo, no requerir instrumentos sofisticados y la posibilidad de su automatización parcial en laboratorios con gran carga asistencial.

Los agentes precipitantes más utilizados son:

- Heparina-cloruro de manganeso (II).
- Sulfato de dextrano-cloruro de magnesio (II)
- Ácido fosfotúngstico-cloruro de magnesio (II)
- Concanavalina A

3.2.1 Precipitación con heparina-cloruro de manganeso (II)

Este método, descrito por Burnstein y Samaille en 1960 (7), fue aconsejado por el *Lipid Research Clinics Program* (8) en 1974 y utiliza como agentes precipitantes la heparina sódica y el cloruro de manganeso (II). A una alícuota del espécimen se le añade cantidad suficiente de solución de heparina (5000 kU/L) y cloruro de manganeso (II), para obtener una concentración final de 46 mmol/L. Se mantiene la mezcla de reacción durante 30 minutos en hielo y se centrifuga a 1500xg, 30 minutos y a 4°C. En una alícuota del sobrenadante se mide la concentración de colesterol correspondiente a las HDL. Estudios posteriores demostraron que aumentando la concentración final de cloruro de manganeso (II) a 92 mmol/L se mejora la capacidad de precipitación (9).

Los mayores inconvenientes descritos del método son:

- Su incompatibilidad con los sistemas enzimáticos utilizados en la medición de la concentración de colesterol que utilizan tampón fosfato (10) debido a que el manganeso (II) puede formar complejos con aquél. Esta interferencia, debida a la turbidez originada, no ocurre cuando se utiliza tampón tris(hidroximetil)aminometano-HCl.
- En muestras con una concentración alta de triglicérido pueden existir fallos en la precipitación por formación de un complejo insoluble de baja densidad que no sedimenta completamente (11, 12).
- Otro inconveniente descrito es la gran variabilidad de las preparaciones comerciales de heparina, que hace necesario comprobarse la efectividad como precipitante en cada lote (13).

3.2.2 Precipitación con sulfato de dextrano-cloruro de magnesio (II)

El agente precipitante es una mezcla a partes iguales de una solución de 20 g/L de sulfato de dextrano de masa molar 500000 y una disolución 2,0 mol/L de cloruro de magnesio, con una concentración final de 0,9 g/L y 91 mmol/L respectivamente (14). Una posible mejora de este método consiste en mezclar volúmenes iguales de una solución de 20 g/L de sulfato de dextrano masa molar 50000 y solución 1,0 mol/L de cloruro de magnesio, con una concentración final de 0,9 g/L y 45

mmol/L respectivamente (15). Con este último sin embargo los valores obtenidos son significativamente más bajos que con el primero. Esta modificación con el dextrano de masa molar 50000 fue un método seleccionado en 1983 por la *American Association of Clinical Chemistry*. La capacidad de precipitación de este reactivo es débil (16) y se observan gran proporción de sobrenadantes turbios de muestras con concentraciones elevadas de VLDL o lipoproteínas anormales.

3.2.3 Precipitación con ácido fosfotúngstico-cloruro de magnesio (II)

Fue descrito por Burstein et al. en 1970 (17) y utiliza como agente precipitante una mezcla en proporción 4:1 de una disolución de 40 g/L de fosfotungstato de sodio y una solución 2,0 mol/L de cloruro de magnesio, con una concentración final de 4,0 g/L y 50 mmol/L respectivamente. Una adaptación (18) descrita de este reactivo con variaciones en el pH y en las concentraciones finales (1,6 g/L de ácido fosfotúngstico y 25 mmol/L de cloruro de magnesio con pH de 2,5) mejora su rendimiento y presenta diversas ventajas (19).

La capacidad de precipitación de las lipoproteínas con apolipoproteína B es buena, pero el aclaramiento de los sobrenadantes depende de la concentración de triglicérido. Para disminuir la variabilidad y en particular conseguir una mejor reproducibilidad es necesario controlar estrechamente todos los pasos del procedimiento, particularmente los tiempos de incubación y las condiciones de centrifugación.

3.2.4 Precipitación con polietilenglicol

En 1976 Viikari (20) describió un método que utiliza una disolución de polietilenglicol de masa molar 6000 a una concentración final del 12% como agente precipitante de las lipoproteínas no HDL. Esta concentración es excesivamente elevada y da lugar a una precipitación parcial de HDL, por lo que estudios posteriores aconsejan seleccionar una concentración final menor (11), con la que ya no se detecta apolipoproteína B en los sobrenadantes y con la que permanece en los mismos toda la apolipoproteína A presente inicialmente en las muestras.

Kostner et al. (21) en 1985 describieron una modificación que utiliza polietilenglicol 20000 al 9,5% en solución amortiguadora de fosfato de sodio a pH=6,5. Los métodos basados en polietilenglicol son los que poseen una mayor capacidad de precipitación sobre las LDL y VLDL e incluso VLDL anormales. Sin embargo, son los más afectados por la procedencia de los reactivos y los que realizan una mayor dilución de la muestra (22).

3.2.5 Precipitación con concanavalina A

El agente precipitante es una solución de 3,3 g/L de concanavalina A en solución de 9 g/L de cloruro de sodio (23). Necesita para su actuación intervalos de pH muy ajustados, por lo que la preparación debe hacerse diariamente. La capacidad de precipitación es buena tanto para LDL como para VLDL, obteniéndose sobrenadantes transparentes en el 100% de los casos, incluso con concentraciones de triglicérido de 8,9 mmol/L, pero es un método caro con respecto al resto de los estudiados.

3.2.6 Consideraciones sobre la determinación de la concentración en suero del colesterol de HDL, mediante los métodos de separación de las HDL por precipitación

Durante las últimas décadas la cuantificación del colesterol de las HDL en los laboratorios clínicos se ha realizado casi exclusivamente por estos métodos, aunque hay una tendencia previsible a abandonarlos. Por ello, es interesante hacer algunas consideraciones tendentes a su estandarización y a disminuir la variabilidad intra y entre laboratorios:

3.2.6.1 El proceso inicial de precipitación es muy sensible a interferencias externas y requiere unas condiciones muy controladas de pipeteado, homogeneización de la mezcla reactiva, temperatura y tiempo de incubación, así como el respeto escrupuloso de las condiciones de centrifugación indicadas por el fabricante (aceleración expresada en g y eventual temperatura de incubación) y evitar retrasos en la separación del sobrenadante. Estos pasos son difícilmente automatizables en la práctica habitual aunque se ha intentado facilitar con pipeteadores automáticos o con el empleo de tubos comerciales preparados con el reactivo precipitante.

3.2.6.2 La efectividad de la separación del método elegido se debe evaluar en especímenes de pacientes a concentraciones variables de triglicérido. La presencia de quilomicrones y concentraciones elevadas de las VLDL puede ser la causa de una sobreestimación errónea del colesterol contenido en las HDL. Se recomiendan las siguientes pruebas para evaluar la especificidad del método elegido:

- realizar una electroforesis del precipitado resolubilizado y lavado con cloruro de sodio (0,6 mol/L) y del sobrenadante obtenidos tras la fase de separación de las lipoproteínas con apolipoproteína B. En el sobrenadante se debería observar sólo la banda alfa de las HDL.

- valorar la presencia de apolipoproteínas A-I y B en el sobrenadante y precipitado resolubilizado. La presencia de apolipoproteína B en el sobrenadante sugiere su contaminación con lipoproteína B en el sobrenadante sugiere su contaminación con lipoproteínas no HDL, y altas concentraciones de apolipoproteína AI en el precipitado indican precipitación parcial de las HDL.

3.2.6.3 La cuantificación posterior del colesterol en el sobrenadante obtenido se puede realizar en analizadores automáticos. Es conveniente adecuar las proporciones de muestra y reactivo con el fin de conseguir unas absorbancias óptimas, debido a las bajas concentraciones habituales de colesterol de las HDL y a la dilución que se introduce al añadir los reactivos precipitantes.

3.2.6.4 Empleo de materiales de control en todas las series analíticas, sometidos al proceso de separación al igual que las muestras de pacientes. Es deseable que sean específicos para descartar la influencia de la matriz de los materiales habituales, y con valor asignado por un método y procedimiento con trazabilidad conocida. El número de materiales de control deseable son 2 y con una concentración próxima a los valores discriminantes de la concentración en suero de colesterol de HDL (0,91 y 1,55 mmol/L).

3.2.6.5 En los criterios en la selección del reactivo precipitante se pueden considerar los siguientes aspectos:

- El efecto desfavorable causado por la dilución de las muestras de suero con el reactivo precipitante en el que se determinará posteriormente la concentración de colesterol.

- La frecuencia de precipitación incompleta de los sueros con concentraciones elevadas de triglicérido, máxime si la alternativa dada por algunos métodos es diluir aún más la muestra inicial. Por ello es desaconsejable realizar la separación en aquellas muestras que no hayan sido tomadas en ayunas.

- En España, la mayor parte de los laboratorios clínicos emplean reactivos comerciales de sulfato de dextrano o fosfotungstato de magnesio. Según los datos del control de calidad de la SEQC del año 1996, un 75% utiliza ácido fosfotúngstico y cloruro de magnesio (II), un 15% sulfato de dextrano y un 4% polietilenglicol (24).

3.3 Métodos de ultracentrifugación

La ultracentrifugación es el principio analítico clásico para la separación y cuantificación de las lipoproteínas. En ella se

aprovecha el hecho de que las lipoproteínas tienen una densidad inferior al resto de las proteínas plasmáticas y se fuerza su flotación a densidades concretas por medio de campos gravitatorios intensos. De hecho la nomenclatura clásica utilizada en la literatura para describir las diferentes lipoproteínas se basa en sus densidades: así las VLDL incluyen partículas cuya densidad es \leq de 1,006 kg/L; el intervalo de densidad de las LDL abarca de 1,006 a 1,063 kg/L y el de las HDL entre 1,063 y 1,210 kg/L, concretamente 1,063-1,125 kg/L para la fracción 2 de las HDL y de 1,125-1,210 kg/L para la fracción 3.

Dado que la ultracentrifugación permite la separación de las lipoproteínas utilizando criterios de densidad, actualmente es considerada como el procedimiento de comparación para la separación y cuantificación de las lipoproteínas. Sin embargo, la ultracentrifugación no cumple los estrictos criterios necesarios para ser considerado método de referencia: la recuperación completa y reproducible es difícil y las fracciones obtenidas son heterogéneas y pueden contener otras partículas funcionales. No obstante, se describe a continuación dado que actualmente es considerado «transitoriamente» como tal y habitualmente es utilizado para la validación de los otros métodos habituales en estudios epidemiológicos, pues los valores discriminantes establecidos para una aplicación universal lo fueron con este tipo de métodos. Existen tres tipos principales de ultracentrifugación: secuencial, en gradiente de densidad y ultracentrifugación zonal.

3.3.1 Ultracentrifugación secuencial

Fue descrita inicialmente por Havel et al. (25) en 1955. Se basa en realizar repetidas ultracentrifugaciones ajustando sucesivamente los infranadantes obtenidos a las densidades límite de cada una de las familias de lipoproteínas que queremos aislar. Las lipoproteínas HDL se pueden aislar a una densidad de 1,210 kg/L después de separar las VLDL y LDL. Ese método requiere tantas ultracentrifugaciones sucesivas como clases de lipoproteínas queramos aislar.

Es laborioso, prolongado y puede dar lugar a alteraciones estructurales de las HDL provocadas por artefactos durante el proceso. Además existen otras subpoblaciones, habitualmente minoritarias, de otras lipoproteínas (HDL tipo 1 con intervalo de densidad de 1,055 a 1,115 kg/L y lipoproteína (a) con intervalo de densidad de 1,055 a 1,085 kg/L), que pueden aislarse con la población de las HDL. Se utiliza con fines preparativos, pero su utilidad clínica es limitada.

3.3.2 Ultracentrifugación en gradiente de densidad

Este método permite la separación de las principales clases de lipoproteínas y sus subfracciones en una sola ultracentrifugación (26). El procedimiento consiste en colocar el espécimen (previamente ajustado a una densidad superior a 1,220 kg/L) en el fondo de un tubo de ultracentrífuga y superponer sobre el mismo soluciones de diversas concentraciones de bromuro de potasio con densidades de 1,210, 1,100 y 1,000 kg/L. Durante la ultracentrifugación las lipoproteínas se distribuyen en el gradiente de acuerdo con su propia densidad: en la parte inferior del tubo se obtiene suero deficiente en lipoproteínas y por encima en este orden las HDL, las LDL, las IDL y por último las VLDL.

Es un método relativamente rápido y, por realizarse en una sola centrifugación, evita posibles contaminaciones. La necesaria identificación visual de las lipoproteínas para su posterior separación se consigue mediante la adición previa del colorante azul de Coomassie. Los principales inconvenientes descritos son el número reducido de muestras que pueden ser procesadas y la dificultad de separación de familias de lipoproteínas con densidades muy próximas, como las HDL tipo 2 y las HDL tipo 3 (22).

3.3.3 Ultracentrifugación analítica o zonal

La ultracentrifugación zonal, también llamada analítica, es un método sofisticado para el análisis cuantitativo de las lipoproteínas desarrollado en 1950 y que continúa hoy utilizándose en algunos laboratorios de investigación (27). Las diversas lipoproteínas son separadas según su velocidad de flotación y cuantificadas por refracción, por tanto se precisa de un sistema óptico incorporado a la centrífuga. Este método permite medir la masa total de HDL, pero no da información sobre la composición en lípidos o proteínas. Requiere equipos especiales y una considerable experiencia en el análisis de datos. Por estas razones este tipo de ultracentrifugación no se utiliza en los laboratorios clínicos.

3.3.4 Ultracentrifugación a densidad 1,063 kg/L

La separación de las HDL se lleva a cabo en una sola ultracentrifugación a densidad de 1,063 kg/L (28). En la fracción superior flotan las lipoproteínas de densidad menor que las HDL (los quilomicrones, las VLDL y las LDL) y quedan las HDL y las proteínas séricas en la parte inferior. Si a continuación se ajusta el infranadante a una densidad de 1,210 kg/L y se somete a una nueva ultracentrifugación, se puede separar las HDL del resto de las proteínas. Sin embargo, para análisis cuantitativos se considera a las HDL como la fracción de densidad mayor a 1,063 kg/L.

3.3.5 Consideraciones sobre los métodos de ultracentrifugación para la separación de las HDL en suero y la determinación de la concentración del colesterol de las HDL

La separación y cuantificación de las HDL por ultracentrifugación presenta algunos problemas.

3.3.5.1 Todos los procedimientos de ultracentrifugación para la separación de lipoproteínas son relativamente caros por el coste del equipo y el tiempo de operador requerido y por tanto son utilizados sólo en algunos laboratorios especiales o con fines de investigación.

3.3.5.2 La fracción de las HDL se puede contaminar con lipoproteínas no HDL.

La lipoproteína (a) se distribuye en un intervalo de densidades, entre 1,050 y 1,110 kg/L, entre la HDL y LDL, y por tanto puede ser separada en parte junto con las lipoproteínas HDL, produciéndose un error por exceso proporcional a la concentración de lipoproteína(a) en suero (29). Esta interferencia es importante pues aproximadamente el 25% de la población general presenta concentraciones plasmáticas de lipoproteína(a) superiores a 0,3 g/L.

3.3.5.3 Las elevadas concentraciones salinas utilizadas para los ajustes de densidad pueden alterar las características fisicoquímicas de las HDL (30).

3.3.5.4 La recuperación de las HDL es a menudo inferior al 90%.

La fiabilidad del método depende de la habilidad técnica del operador para realizar una recuperación y transferencia exacta de las diferentes fracciones desde el tubo de la ultracentrífuga.

Influyendo además, la dilución, a veces en una proporción desconocida, de las fracciones recuperadas.

3.3.5.5 Es difícil el acceso a materiales de control adecuados, pues estos deben ser «frescos» ya que los procesos de liofilización, habituales para la conservación de los materiales de control, producen modificaciones fisicoquímicas en las lipoproteínas que influyen en la recuperación y estabilidad de las lipoproteínas y sus componentes.

3.3.5.6 Son aplicables las recomendaciones respecto a la determinación de la concentración de colesterol anteriormente descritas para los métodos de precipitación.

3.4 Métodos combinados de ultracentrifugación y precipitación

En este apartado se agrupan los métodos que combinan las características de más de uno de los descritos anteriormente. El método recomendado actualmente para la separación habitual de las HDL por la *Lipid Research Clinics* (8) aprovecha las ventajas de los métodos de ultracentrifugación y precipitación. Inicialmente, se realiza una separación por ultracentrifugación y precipitación. Inicialmente, se realiza una separación por ultracentrifugación a densidad 1,006 kg/L, para aislar VLDL y quilomicrones de las LDL y HDL. A continuación, se precipitan selectivamente las LDL del infranadante, y por último se cuantifica el colesterol de las HDL que permanecen en el sobrenadante.

Debido a que en el primer paso se separan las lipoproteínas con alto contenido en triglicérido (VLDL y quilomicrones) se elimina la posible interferencia de las mismas con los agentes químicos precipitantes. De este modo, puede utilizarse cualquiera de los métodos de precipitación descritos anteriormente.

3.5 Métodos directos

En estos últimos años, se ha hecho un esfuerzo importante para desarrollar nuevos métodos menos laboriosos y costosos, que sean fácilmente automatizables teniendo en cuenta el gran aumento de la demanda de esta magnitud y la gran variabilidad analítica atribuible a la imposibilidad de su automatización. Los investigadores han diseñado procedimientos con el fin de cuantificar el colesterol por métodos enzimáticos en un sistema donde se inhibe la reacción del colesterol contenido en las lipoproteínas no HDL. Esta inhibición se puede realizar con diferentes principios analíticos:

a) enzimas modificadas con polietilenglicol y sulfato de α -ciclodextrinas (31). La α -ciclodextrina sulfatada en presencia de iones magnesio y a pH neutro actúa como agente secuestrante del colesterol de la lipoproteína con baja proporción proteína/lípido (quilomicrones, VLDL y LDL). Las enzimas colesterol esterasa y colesterol oxidasa modificadas con polietilenglicol 6000 muestran una actividad catalítica selectiva hacia el colesterol de HDL, reaccionando con el colesterol de las lipoproteínas en el orden: HDL > quilomicrones > VLDL > LDL. El mecanismo de dicha selectividad no se ha demostrado claramente, aunque puede estar relacionado con la capacidad de reconocer diferencias en la hidratación, carga o tamaño de las diferentes lipoproteínas.

b) polietilenglicol de masa molar 4000 y anticuerpos contra las apolipoproteínas B y C-III (32). El polietilenglicol forma complejos con los quilomicrones, las VLDL y las LDL y los anticuerpos producen agregados con dichas lipoproteínas; a continuación se produce la reacción enzimática del colesterol de las HDL que permanece en disolución.

c) polímeros y polianiones que forman complejos no reactivos con los quilomicrones, las VLDL y las LDL. Las HDL se solubilizan por un detergente liberando el colesterol y sus ésteres que pueden ser cuantificados por métodos enzimáticos (33).

d) anticuerpos contra las lipoproteínas con apolipoproteína B (34) que inhiben directamente la reacción del colesterol contenido en las HDL (34).

3.5.1 Consideraciones sobre los métodos directos para la determinación de la concentración del colesterol de las HDL
La mayor ventaja de estos métodos es la eliminación de los pasos manuales de los procedimientos de precipitación. Se han adaptado a diferentes analizadores, donde se lleva a cabo la

cuantificación, junto con el colesterol y triglicérido, en un único espécimen con las consiguientes ventajas que ello supone en los laboratorios clínicos con gran demanda asistencial.

Pero estos nuevos métodos y reactivos todavía deben ser evaluados en profundidad, particularmente para conocer si alguno de ellos puede o no substituir a los métodos de precipitación habitualmente utilizados. Todos ellos deben ser validados y comparados robustamente frente al método de referencia, con el que se establecieron los valores discriminantes, y deben ser capaces de cumplir los criterios analíticos de calidad definidos. Los fabricantes y distribuidores de reactivos deben establecer el sistema adecuado de trazabilidad, exigible a las determinaciones de lípidos y lipoproteínas.

Ante la posibilidad de un cambio a estos métodos, cada laboratorio debería comprobar:

– La inexistencia, o eventual corrección, de diferencias significativas con los resultados medidos por el método actualmente utilizado, mediante un análisis de regresión y de comparación de métodos adecuado. Previamente, se debe comprobar que el método actual, generalmente de precipitación, tiene una inexactitud aceptable, mediante el empleo de materiales de control con un valor asignado mediante un método y procedimientos adecuados, o mediante sistemas de control de la calidad específicos de las determinaciones lipídicas.

– Comprobar que la imprecisión interdiaria de los métodos directos es inferior a la alcanzada por los métodos de precipitación.

– Utilizar materiales de calibración con trazabilidad definida, así como materiales de control preferiblemente con valores asignados por un método y procedimiento de trazabilidad definida.

– Comprobar el comportamiento frente a sueros con elevada concentración de triglicérido y de lipoproteínas VLDL y quilomicrones, así como otros eventuales interferentes.

Las primeras evaluaciones publicadas (35-37) indican que poseen una imprecisión analítica similar o mejor a las concentraciones con significado clínico. La inexactitud se debe evaluar en estudios más amplios y por comparación con el método de referencia recomendado.

4 MÉTODO DE REFERENCIA

El desarrollo de un sistema de referencia para las mediciones de la concentración de colesterol de las HDL, como existe para la determinación de colesterol, necesita, en primer lugar, una definición clara de estas lipoproteínas independiente del método utilizado para su aislamiento y en segundo lugar, el desarrollo de un método definitivo. Aunque estas condiciones no se cumplen actualmente, existe un consenso mundial sobre la conveniencia de seguir utilizando como punto de «referencia» el método (38) desarrollado por el *Center for Diseases Control and Prevention* (CDC).

Este método no ha sido aprobado y validado como método de referencia en el sentido estricto, pero ha sido la base de los amplios estudios epidemiológicos y clínicos en los que se fundamentan los valores discriminantes utilizados para la asignación del riesgo coronario. Por tanto, este método se puede considerar el punto de referencia que mantendrá la unión entre las medidas de colesterol de las HDL por cualquiera de los métodos habituales y las bases de datos epidemiológicas disponibles.

El método de referencia propuesto es un procedimiento combinado que consta de tres pasos:

a) ultracentrifugación a 100000xg y a 4°C del espécimen a densidad 1,006 kg/L, lo que permite la separación de quilomicrones y VLDL en el sobrenadante.

b) precipitación de lipoproteínas que contienen apolipoproteína B, en el infranadante obtenido, con heparina y cloruro de manganeso (II) a concentración final de 46 mmol/L.

c) medición de la concentración del colesterol de las HDL en el sobrenadante por el método de referencia de Abell-Kendall modificado (39).

Es un método técnicamente laborioso, costoso, necesita gran volumen de muestra y disponer de ultracentrifuga y materiales apropiados, pero es el método recomendado para establecer y controlar la exactitud de los métodos habituales, así como para la eventual validación, con fines de investigación epidemiológica, de la utilización de los otros métodos habitualmente utilizados.

El CDC, en su esfuerzo para conseguir una estandarización adecuada en las medidas de colesterol de las HDL, mantiene programas dirigidos a la industria para la evaluación de las características de los reactivos respecto a este método de referencia (28).

5 CRITERIOS DE CALIDAD

Los problemas de la cuantificación del colesterol contenido en las HDL son importantes y todavía no han sido resueltos por completo, a causa de la falta de estandarización de los métodos empleados para la estimación del mismo (40,41). De hecho, hasta hace pocos años, los métodos se han desarrollado y comercializado sin tener en cuenta su concordancia con un método de referencia y sin existir unas líneas claras en cuanto a la imprecisión. Numerosos estudios indican la necesidad de mejorar de forma sustancial las medidas de colesterol de las HDL, que se realizan en los laboratorios clínicos desde hace más de 20 años, para garantizar que los resultados obtenidos cumplan los requisitos de calidad suficientes y sean útiles en la práctica clínica (42).

Se deben controlar los componentes de la variación analítica: inexactitud e imprecisión:

1. La inexactitud en la medición de la concentración de colesterol de las HDL es de gran importancia debido a varias razones: el intervalo de concentraciones con las que se asocia un determinado riesgo de desarrollar enfermedad es estrecho; el valor discriminante aceptado para la asignación del riesgo de enfermedad cardiovascular se sitúa en concentraciones bajas (0,91 mmol/L); por último, muchos laboratorios utilizan la concentración de colesterol de las HDL para calcular la concentración del colesterol de las LDL por la fórmula de Friedewald. Por lo que un error en su determinación supone un cálculo erróneo del colesterol de las LDL.

La inexactitud (diferencia entre el valor verdadero y el medido) puede ser debida: a la utilización de materiales de calibración inapropiados, ya que el llamado efecto matriz puede afectar de manera no previsible a estos materiales; y a la separación inadecuada de la fracción de las HDL.

2. La imprecisión refleja la variación en el proceso de medida y a ella pueden contribuir el operador, las diferencias entre lotes de reactivos y variaciones en los instrumentos.

Debe ser minimizada con la estandarización del proceso técnico y la aplicación de un sistema de control de la calidad.

En 1995 el *National Cholesterol Education Program* (3) recomendó definir los objetivos de calidad, que deben cumplir las determinaciones de colesterol de HDL, en términos de «error total» (anexo I). El error total comprende la imprecisión y la inexactitud y así se pretende compensar una posible mayor inexactitud con una baja imprecisión o al contrario. El laboratorio clínico puede seleccionar cualquiera de los métodos descritos previamente para la cuantificación del colesterol HDL en especímenes de pacientes, pero el procedimiento deberá siempre cumplir los criterios de calidad analítica mínimos siguientes:

Error total $\leq 13\%$ que implica:

Inexactitud $\leq \pm 5\%$ (comparado con el método referencia del CDC)

Imprecisión a concentración $\geq 1,09$ mmol/L: $CV \leq 4\%$
a concentración $< 1,09$ mmol/L: $s \leq 0,044$ mmol/L

6 ESPÉCIMEN Y MUESTRA

La muestra de elección es el suero; obtenido al centrifugar la sangre, en condiciones refrigeradas, antes de transcurridas 3 horas de su toma. El suero es la muestra de elección porque es con el que se han establecido los valores discriminantes aceptados para la clasificación de los pacientes. Sin embargo, en el caso de utilizar plasma se ha propuesto que los valores plasmáticos deben multiplicarse por 1,03 para obtener los correspondientes en suero.

Conservación: la medición de la concentración del colesterol de las HDL se debe realizar lo antes posible, preferiblemente el mismo día de la extracción. No obstante el suero se puede almacenar a 4 °C y en oscuridad durante 1-2 días. Para períodos más prolongados se debe mantener congelado a -20 °C (1 mes) o a -80 °C (hasta 2 años) en contenedores adecuados para prevenir la evaporación (3).

7 RECOMENDACIONES PRÁCTICAS

7.1 Métodos recomendados en la práctica habitual

La necesidad de personal especializado y el relativo alto coste económico de la ultracentrifugación han favorecido la utilización de técnicas alternativas como métodos habituales. Debido a ello los métodos habituales para la determinación del colesterol de las HDL en suero son los métodos de precipitación química, con cuantificación posterior del colesterol en el sobrenadante por métodos enzimáticos. Pero las variaciones encontradas entre laboratorios son muy amplias.

El desarrollo de métodos más simples, los llamados métodos directos, puede facilitar la estandarización de estas medidas en el laboratorio clínico. Los métodos directos pueden cumplir estas expectativas, pero antes de adoptar un nuevo método se debe seguir las recomendaciones dadas anteriormente.

7.2 Reducir las causas preanalíticas de variación: Control de la variabilidad biológica

Los especímenes para la medición de la concentración de colesterol de las HDL se deben obtener en las condiciones recomendadas para la determinación de colesterol (39). Los coeficientes de variación biológicos intraindividuales descritos para el colesterol de las HDL son altos, comprendidos entre 4-12% con una media del 8%. Debido a ello la determinación en una sola ocasión es insuficiente para establecer la concentración «habitual» del paciente. En base a las concentraciones habituales de colesterol de las HDL, al coeficiente de variación biológico intraindividual medio y a los objetivos de calidad propuestos, se recomienda la extracción de dos especímenes de sangre como mínimo con un intervalo de una semana (3).

7.3 Control de la inexactitud

La inexactitud en la medida de las concentraciones del colesterol de las HDL debería establecerse mediante comparación con

especímenes frescos congelados respecto al método considerado de referencia. En nuestro país no existe ningún sistema de referencia al que acudir para realizar esta verificación. El *Cholesterol Reference Method Laboratory Network* y el *Center for Diseases Control* facilitan un programa destinado a verificar los materiales de calibración y control (43). Además disponen de un programa dirigido a la industria para la evaluación de la calidad de los reactivos en términos de inexactitud y imprecisión. De esta forma es posible el desarrollo de métodos habituales con los que obtener resultados comparables al método aceptado como de referencia y conseguir la estandarización de las determinaciones de colesterol HDL en los laboratorios clínicos. Se debe exigir a las empresas que comercializan estos reactivos y los materiales de control y de calibración la acreditación de los mismos frente al método de referencia.

7.4 Realizar programas de control de la calidad interno y externo

El control de la calidad interno se debe realizar con materiales que emulen las características de los especímenes de pacientes y debe abarcar todos los pasos del procedimiento. Se recomienda por lo menos a dos concentraciones de decisión clínica 0,9 mmol/L y 1,55 mmol/L. Además, todos los laboratorios deberían participar en un programa de calidad externo, que sea capaz de aportar materiales adecuados y con los menores efectos matriz posibles.

7.5 Las organizaciones científicas deberían...

- Incluir en sus programas de control de la calidad la medición de la concentración de las HDL con materiales adecuados.
- Proporcionar los valores obtenidos por el método de referencia en las mezclas utilizadas como materiales de control de la calidad.
- Promover la consideración de la trazabilidad como criterio de selección de sistemas analíticos.

8 CONSIDERACIÓN FINAL

Es necesario el desarrollo y evaluación de nuevos métodos para la medición de las concentraciones del colesterol de HDL que por sus características sean capaces de cumplir los objetivos de calidad deseables para esta magnitud y especificados anteriormente. Asimismo es urgente el desarrollo de materiales de referencia adecuados.

En España es una necesidad urgente establecer un sistema nacional de referencia para las mediciones de las concentraciones de colesterol y colesterol de las HDL que aporte la tecnología suficiente para comparar nuestro método habitual con el método de referencia. A nivel internacional existen programas específicos que facilitan este proceso de estandarización tanto para los laboratorios clínicos como para las empresas fabricantes. En nuestro país no existen, aunque es de suponer que de forma indirecta nos habremos beneficiado de los mismos por el carácter multinacional de la mayor parte de las empresas fabricantes de reactivos.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Ginsberg GS, Safran C, Pasternak RC. Frequency of low serum high density lipoprotein cholesterol levels in hospitalised patients with «desirable» total cholesterol levels. *Am J Cardiol* 1991; 68: 187-92.
2. The Expert Panel. Summary of the second report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel II). *JAMA* 1993; 269: 3015-23.
3. Warnick GR, Wood PD. National Cholesterol Education Program Recommendations for Measurement of High-Density Lipoprotein Cholesterol: Executive Summary. *Clin Chem* 1995; 41: 1427-33.
4. Fredrickson DS, Levy RI, Lees RS. Fat transport in lipoproteins. An integrated approach to mechanisms and disorders. *N Engl J Med* 1967; 276: 32-44.
5. Gómez Gerique JA. Métodos de laboratorio para el estudio de las dislipemias. En: *Lipoproteínas plasmáticas*. Barcelona: Boehringer Mannheim; 1988. p. 93-109.
6. Fruchart JC. Separations des lipoprotéines en fonction de leur composition en apolipoprotéines. Applications cliniques. *Ann Biol Clin* 1980; 44: 116-21.
7. Burstein M, Samaille J. Sur un dosage rapide du cholestérol lié aux alpha et aux beta lipoprotéines du sérum. *Clin Chim Acta* 1960; 5: 609.
8. Lipid Research Clinic Program, Manual of laboratory operations. Lipid and lipoprotein analysis. DHEW Publication 1974; 1: 75-628.
9. Albers JJ, Warnick GR, Wiebe D, Chung MC. Multi-laboratory comparison of three heparin-Mn precipitation procedures for estimating cholesterol in high density lipoprotein. *Clin Chem* 1978; 24: 853-6.
10. Steel BW, Koehler D, Azar MM, Blaszowski TP, Kuba K, Demsey ME. Enzymatic determinations of cholesterol in high density lipoprotein fractions prepared by a precipitation technique. *Clin Chem* 1976; 22: 98-101.
11. Gómez JA, Rodríguez Llach JM. Determinación de colesterol de HDL mediante métodos de precipitación: Estudio de los posibles factores que pudieran modificar el resultado final en cada uno de ellos. *Quim Clin* 1984; 3: 249-61.
12. Assmann G, Schriewer H. Possibilities and limitation of the analysis of HDL cholesterol. *J Clin Chem Biochem* 1981; 19: 1-6.
13. Bachorick PS, Wood PD, Albers JJ, Steiner P, Demsey ME, Kuba K, et al. Plasma high-density lipoprotein cholesterol concentration determined after removal of other protein by heparin manganese precipitation or by ultracentrifugation. *Clin Chem* 1976; 22: 1828-34.
14. Finley PR, Schiffman RB, Williams RJ, Licht DA. Cholesterol in high density lipoprotein: Use of Mg²⁺/dextran sulfate in its enzymatic measurement. *Clin Chem* 1978; 24: 931-3.
15. Warnick GR, Benderson J, Albers JJ. Dextran-sulfate-Mg²⁺ precipitation for quantification of high density lipoprotein cholesterol. *Clin Chem* 1982; 28: 1379-88.
16. Warnick GR, Nguyen T, Albers AA. Comparison of improved methods for quantification of high-density lipoprotein cholesterol. *Clin Chem* 1985; 31: 217-22.
17. Burstein M, Scholnick HR, Morfin R. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. *J Lipid Res* 1970; 11: 583-95.
18. Lopes-Virella MF, Stone P, Ellis S, Colwell JA. Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by three different methods. *Clin Chem* 1977; 23: 882-4.
19. Assmann G, Shrlower H, Schmitz G, Hagale E. Quantification high density lipoprotein cholesterol by precipitation with fosfotungstic acid/Mg C₁₂. *Clin Chem* 1983; 29: 2026-30.
20. Viikari J. Precipitation of plasma lipoprotein by PEG-6000 and its evaluation with electrophoresis and ultracentrifugation. *Scand J Clin Lab Invest* 1976; 36: 265-8.
21. Kostner GM, Molinari E, Pichler P. Evaluation of a new HDL₂/HDL₃ quantification method based on precipitation with polyethylene glycol. *Clin Chim Acta* 1985; 148: 139-47.
22. Gómez Gerique JA. Análisis de los lípidos y lipoproteínas del plasma. En: *Estudio de las dislipemias*. Barcelona: MCR SA; 1988.
23. McConalhy W, Alaupovic P. Studies on the interaction of concanavalina A with major density classes of human plasma lipoproteins. Evidence for the specific binding of lipoprotein B in its associated and free forms. *FEBS* 1974; 41: 174-6.
24. Programa de Evaluación Externa de la Calidad de Bioquímica (suero) de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. *Quim Clin* 1997; 16: 62-3.
25. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955; 34: 1345-53.
26. Demacker PN, Sommerend-Zondag DF, Stanlenhoef AF, Stuyt PM, Van't Laar A. Ultracentrifugation in swimwing-bucker and fixed angle rotors evaluated for isolation and determination of high density lipoprotein subfractions HDL₂ and HDL₃. *Clin Chem* 1983; 29: 656-63.
27. Wilcox HG, Davis DC, Heimberg M. The isolation of lipoprotein from human plasma by ultracentrifugation in zonal rotors. *J Lipid Res* 1971; 12: 160-72.
28. Wiebe DA, Warnick GR. Measurement of high density lipoprotein cholesterol concentration. En: *Laboratory easurement of lipids, lipoproteins and apolipoproteins*. Washington. AACC Press; 1994. p. 91-106.
29. Álvarez JJ, Lasunción MA, Olmos JM, Herrera E. Interferencia de la lipoproteína (a) en la cuantificación del colesterol de las HDL mediante ultracentrifugación. *Clin Invest Arteriosclerosis* 1990; 2: 146-52.

30. Wiebe DA, Smith SJ. Six methods for isolating high density lipoprotein compared, with use of the reference method of quantifying cholesterol in serum. *Clin Chem* 1985; 31: 746-50.
31. Sugiuchi H, Uji Y, Okabe H, Irie T, Uckama K, Kayahara N. Direct measurement of high density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol modified enzymes and sulfated cyclodextrin. *Clin Chem* 1995; 41: 717-23.
32. Nauck M, Marz W, Haas B, Wieland H. Homogeneous assay for direct determination of high-density lipoprotein cholesterol evaluated. *Clin Chem* 1996; 42: 424-9.
33. Harris N, Galpchian V, Thomas J, Iannotti E, Law T, Rifai N. Three generations of high-density lipoprotein cholesterol assays compared with ultracentrifugation/dextran sulfate-Mg(II) method. *Clin Chem* 1996; 43: 816-23.
34. Sigma Diagnostics. Procedure n.º 354. St Louis: Sigma; 1997.
35. Harris N, Galpchian V, Rifai N. Three routine methods for measuring high density lipoprotein cholesterol compared with the Reference Method. *Clin Chem* 1996; 42: 738-43.
36. Huang Y, Kao J, Tsai K. Evaluation of two homogeneous methods for measuring high-density lipoprotein cholesterol. *Clin Chem* 1997; 43: 1048-55.
37. Nauck M, Marz W, Jarausch J, Cobbaert C, Sager A, Bernard D, et al. Multicenter evaluation of a homogeneous assay for HDL-cholesterol without sample pretreatment. *Clin Chem* 1997; 43: 1622-9.
38. Duncan IW, Mather A, Cooper GR. The procedure for the proposed cholesterol reference method. Atlanta: Centers for disease control; 1982.
39. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Comisión de Lípidos y Lipoproteínas. Métodos recomendados para la determinación del colesterol en suero o plasma y en otros especímenes biológicos. *Quim Clin* 1994; 13: 496-503.
40. Basil M, Rifkind MD. Status of high density lipoprotein. En: *Cardiovascular Risk Factors*. Medical Progress 1990; 1: 61-7.
41. Naito HK. Reliability of lipid, lipoprotein, and apolipoprotein measurements. *Clin Chem* 1988; 34: B84-B94.
42. Schectman G, Sasse E. Variability of lipid measurements: relevance for the clinician. *Clin Chem* 1993; 39: 1495-503.
43. Myers GL, Cooper GR, Winn CL, Smith SH. The Center for Disease Control, National Heart, Lung and Blood Institute Lipid Standardization Program: An approach to accurate and precise lipid measurement. *Clin Lab Med* 1989; 9: 105-35.

Correspondencia:
Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular
Comisión de Lípidos y Lipoproteínas
c/ Padilla, 323-325, entlo. 4.
08025 Barcelona

Anexo 1

Cálculo del error total

error total = error sistemático + error aleatorio

error total (%) = error sistemático (%) + 1,96 CVt (%)

Cálculo del error sistemático o bias

Es la diferencia entre el valor medido por el método evaluado y el valor medido por el método de referencia expresado en %.

Puede ser medido:

– a través de programas de estandarización que aporten sueros frescos congelados valorados mediante el método de referencia.

– uso de materiales de referencia con valores asignados confirmados frente al método de referencia.

CV_t es el coeficiente de variación analítico total.