

DOCUMENTO DE COMISIÓN/GRUPO DE TRABAJO

Recomendaciones para la estandarización de la medida de lípidos y lipoproteínas. Recomendación (2018)



Juan Carlos Vella Ramírez*, Enrique Rodríguez García, Carlos Romero Román, Beatriz Candás Estébanez, María José Castro Castro, Teresa Arrobas Velilla, Pilar Calmarza Calmarza, Margarita Esteban Salán, Miguel Pocoví Mieras y José Puzo Foncillas

Comisión de Lipoproteínas y Enfermedades Vasculares, Comité Científico, Sociedad Española de Medicina de Laboratorio, España

Recibido el 19 de junio de 2018; aceptado el 14 de agosto de 2018

Disponible en Internet el 2 de noviembre de 2018

PALABRAS CLAVE

Apolipoproteína;
Colesterol;
Enfermedad
cardiovascular;
Estandarización;
Lipoproteína;
Triglicéridos

Resumen Este documento describe recomendaciones para la estandarización de la medida de las magnitudes lipídicas, puesto que resultan críticas para la toma de decisiones clínicas. Deben emplearse métodos recomendados validados frente a un método de referencia o definitivo, y materiales de control que cumplan con la Directiva Europea sobre Diagnóstico *in vitro*; deben cumplir también los objetivos recomendados por el *National Cholesterol Education Program* (NCEP) y la Sociedad Española de Medicina del Laboratorio (SEQC^{ML}). La determinación de colesterol de HDL por métodos homogéneos en equipos automatizados se considera aceptable para la práctica rutinaria, y la fórmula de Friedewald utilizable para estimar la concentración de colesterol de LDL siempre que las concentraciones de triglicéridos sean iguales o inferiores a 200 mg/dL (2,3 mmol/L); en otro caso, se recomienda utilizar la concentración de colesterol-no-HDL. La cuantificación rutinaria de apolipoproteínas A1 y B, y lipoproteína (a), puede efectuarse por métodos de inmunonefelometría e inmunoturbidimetría, con calibradores trazables a materiales de referencia.

© 2018 AEBM, AEFA y SEQC. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Apolipoprotein;
Cardiovascular heart
disease;
Cholesterol;
Lipoprotein;
Standardisation;
Triglycerides

Recommendations for the standardisation of lipids and lipoproteins measurements. Recommendation (2018)

Abstract Some recommendations are presented for standardising the measurement of lipids and lipoproteins, as they are critical for clinical decisions making. Recommended methods validated against a reference or definitive method should be employed, as well as the use of control materials that comply with European Directives on *in vitro* diagnostics. Additionally, the chosen methods must comply with the objectives set forth by the National Cholesterol Education

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: vellajuan1@gmail.com (J.C. Vella Ramírez).

Program (NCEP) and by the Spanish Society of Laboratory Medicine (SEQC^{ML}). Determination of HDL cholesterol using automatic homogenous methods is considered acceptable for normal clinical practice, and the Friedewald Formula is considered to be usable to estimate LDL cholesterol concentration when triglyceride concentrations are below 200 mg/dL (2.3 mmol/L). If this should not be the case, the use of non-HDL cholesterol is recommended. Routine quantification of apolipoproteins A1 and B, and lipoprotein (a) can be measured using immunonephelometric or immunoturbidimetric methods, with calibrators that are traceable to reference materials. © 2018 AEBM, AEFA y SEQC. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

El objetivo de la estandarización es conseguir la comparabilidad de los resultados de medida de las magnitudes biológicas obtenidos cuando un espécimen es analizado utilizando distintos procedimientos de medida¹. El concepto de transferibilidad podría ampliarse a la obtención de resultados comparables entre sí, con objeto de ayudar al paciente que acude al mismo laboratorio varias veces a lo largo del tiempo y, también, cuando es atendido en laboratorios diferentes². La obtención de resultados transferibles adquiere especial relevancia cuando se utilizan valores discriminantes universales, ya sea en el diagnóstico o en el control del tratamiento de los pacientes³.

Las dislipidemias son un tipo de patología usualmente asintomática que suelen detectarse y diagnosticarse con la ayuda de pruebas del laboratorio. Además, las dislipidemias, y en especial las elevaciones de la concentración del colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL), así como los aumentos de apolipoproteína B100 y los descensos del colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y apolipoproteína A1 (apo A1) confieren un mayor riesgo para el desarrollo de enfermedad cardiovascular aterosclerótica^{4,5}. Por ello, para valorar el riesgo que tienen los individuos de padecer enfermedad cardiovascular, las guías recomiendan unánimemente no utilizar únicamente valores discriminantes. Las guías actuales de prevención cardiovascular clasifican a los sujetos en distintas categorías de riesgo según la probabilidad que tengan de desarrollar en un futuro la enfermedad aterosclerótica⁶⁻⁸, para lo cual se tienen en cuenta los principales factores de riesgo establecidos, y en especial la concentración de colesterol de LDL. Precisamente, son los valores de la concentración de colesterol de LDL los más determinantes en las guías para decidir el inicio de la intervención dietética o farmacológica, y además los utilizados para definir las concentraciones deseables (objetivos de prevención) que cada individuo debe alcanzar en función de su nivel de riesgo de padecer enfermedad cardiovascular^{6,7}.

En cualquier caso, para conseguir la transferibilidad de los resultados, es especialmente importante la estandarización de las mediciones de los lípidos y lipoproteínas^{1,9}, siendo para ello necesario disponer de métodos normalizados para la medición de las diferentes magnitudes lipídicas,

y que los laboratorios clínicos adopten unas normas que equiparen su calidad analítica y condiciones preanalíticas con los de aquellos que han generado los valores que se adoptan como discriminantes¹⁰⁻¹⁶.

La fiabilidad de las determinaciones de lípidos y lipoproteínas está definida en función de la calidad del proceso analítico (variación analítica), de los factores previos (variación preanalítica) y de las posibles variaciones posteriores (fase postanalítica). La preanalítica ya ha sido analizada en un documento elaborado por esta comisión¹⁷, y la postanalítica no es objeto del presente documento.

Objetivo y campo de aplicación

El propósito de este documento es desarrollar unas recomendaciones para la estandarización de la fase analítica de las magnitudes lipídicas con el objeto de conseguir que los resultados de las mediciones sean exactos. El campo de aplicación es el del laboratorio clínico, y más concretamente las mediciones de las siguientes magnitudes lipoproteicas: colesterol total, colesterol de LDL, colesterol de HDL, triglicéridos, apo A1, apolipoproteína B (apo B) y lipoproteína (a) (Lp(a)).

Criterios de calidad analítica

La fase analítica o metrológica incluye todos los pasos necesarios para realizar la medición, es decir, la metodología, los reactivos, la instrumentación y el material de calibración y control. Para garantizar la calidad de esta fase, los laboratorios clínicos deberían aplicar criterios similares con respecto a estos factores. Las fuentes de variación de esta fase se traducen en imprecisión o sesgo, y se contemplan en el error analítico total, o error de medida. En consecuencia, la comparabilidad de resultados entre laboratorios dependerá del grado de estandarización de sus mediciones.

Se ha descrito que los materiales de referencia, de calibración y de control utilizados para la medición de las magnitudes lipídicas, a menudo presentan problemas de no conmutabilidad que han sido atribuidos al efecto matriz¹⁸. En este sentido, el *Clinical Laboratory Standards Institute* ha publicado un documento caracterizando y cualificando la conmutabilidad de los materiales de referencia¹⁹.

Tabla 1 NCEP: Objetivos de calidad analítica para las mediciones de lípidos y lipoproteínas

	CV analítica	Error sistemático	Error total
Colesterol total	3%	±3% VReal	8,9%
Triglicéridos	5%	±5% VReal	15%
Colesterol de HDL < 42 mg/dL (1,09 mmol/L)	DE < 1,7 mg/dL (0,044 mmol/L)	±5% VReal	13%
Colesterol de HDL ≥ 42 mg/dL (1,09 mmol/L)	4%	±5% VReal	13%
Colesterol de LDL	4%	±4% VReal	12%

CV: coeficiente de variación; DE: desviación estándar; HDL: lipoproteínas de alta densidad; LDL: lipoproteínas de baja densidad; NCEP: *National Cholesterol Education Program*; VReal: valor real.

Tabla 2 Objetivos de calidad analítica para las mediciones de lípidos y lipoproteínas (mínimas deseables SEQC^{ML})

	Variación biológica		Especificaciones mínimas deseables		
	Cvi (%)	Cvg (%)	Imprecisión (%)	Inexactitud (%)	Error total (%)
Colesterol	5,95	15,30	3,00	4,10	9,00
Colesterol HDL	7,30	21,20	3,65	5,60	13,00
Colesterol LDL	7,80	20,40	3,90	5,50	11,90
Triglicéridos	19,90	32,70	10,00	10,00	26,00
Apolipoproteína A1	6,50	13,80	3,30	3,70	9,10
Apolipoproteína B	6,90	22,80	3,50	6,00	11,00
Lipoproteína (a)	8,50	85,80	No indicado	No indicado	No indicado

Cvg: variación biológica interindividual; Cvi: variación biológica intraindividual; HDL: lipoproteínas de alta densidad; LDL: lipoproteínas de baja densidad; SEQC^{ML}: Sociedad Española de Medicina del Laboratorio.

Requerimientos de calidad analítica

El grupo de trabajo para la medida de lipoproteínas del Programa Nacional de Educación en Colesterol Norteamericano (*National Cholesterol Education Program* [NCEP]) publicó en el año 2001 unos objetivos de calidad analítica para la medición de lípidos y de las principales lipoproteínas (tabla 1)¹⁴, basados en el efecto que tienen las características analíticas en el establecimiento del riesgo cardiovascular. Para poder lograr estos objetivos, la imprecisión debe ser minimizada mediante la estandarización del proceso técnico y la aplicación de un sistema de control de calidad. El sesgo también debe ser minimizado, debido a que el intervalo en el que se asocia un determinado riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular es estrecho.

Por otro lado, Ricós et al.²⁰, basándose en los datos publicados sobre la variabilidad biológica, establecieron en el año 1999 unas especificaciones o requerimientos de calidad analítica a alcanzar en el laboratorio clínico, que satisfacen los requisitos médicos para el diagnóstico, cribado y seguimiento de los pacientes. Estos datos fueron actualizados en el año 2014²¹, estableciéndose requerimientos de calidad mínimos, óptimos y deseables atendiendo a criterios de variabilidad biológica.

En la tabla 2 se exponen las especificaciones recomendadas, que han sido asumidas por la Sociedad Española de Medicina de Laboratorio (SEQC^{ML}).

Procedimientos de medida y materiales de referencia

Para la correcta estandarización de las mediciones de lípidos y lipoproteínas, es preciso disponer de procedimientos

validados frente a un método de referencia o definitivo, empleando un patrón adecuado, conmutable y suficientemente estable.

Para su utilización en el laboratorio clínico se recurre a los métodos recomendados, que emplean procedimientos suficientemente practicables, y con los que es posible alcanzar los objetivos de calidad analítica propuestos. Con todo, la estandarización se complica a veces por falta de materiales de referencia sin la necesaria conmutabilidad, especialmente en las mediciones de apolipoproteínas, lo que ha requerido serios esfuerzos de los comités dedicados a la estandarización de la *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (IFCC) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Calibradores, controles y reactivos

Las concentraciones de los lípidos y lipoproteínas de los materiales de calibración de los sistemas analíticos deben asignarse a partir de los métodos de referencia.

Con este objeto se han establecido programas internacionales dirigidos a los fabricantes como los del *Cholesterol Reference Method Laboratory Network* (CRMLN) y el *Center for Diseases Control and Prevention* (CDC)²² destinados a evaluar las características de los reactivos con respecto a los métodos de referencia, en términos de sesgo, así como de los materiales de calibración y control²³⁻²⁵. En la tabla 3 se esquematizan los materiales de referencia primarios y secundarios para la medición de lípidos y lipoproteínas.

Por otra parte, los fabricantes están obligados por una Directiva Europea a evaluar sus productos, y asegurar su trazabilidad con los sistemas de referencia. Así las cosas,

Tabla 3 Materiales de referencia primarios y secundarios para la medición de lípidos y lipoproteínas

	Material de referencia primario	Material de referencia secundario
Colesterol	Colesterol NIST SRM 911b Colesterol puro	Mezcla sueros congelados del CDC
Triglicéridos	NIST SRM 1595b Tripalmitina	Mezcla sueros congelados del CDC
Colesterol de HDL	No establecido	Mezcla sueros congelados del CDC
Colesterol de LDL	No definido	Mezcla sueros congelados del CDC
Lipoproteína (a)	Lp(a) purificada y liofilizada	OMS/IFCC SRM 2B
Apolipoproteína A1	BCR-CRM 393 (Apo A1 purificada)	OMS/IFCC SP1-01 HDL purificada tamponada (Valor asignado por CDC)
Apolipoproteína B	D = 1,030-1,050 g/mL (LDL purificada por UC)	OMS/IFCC SP3-07 Preparación sérica liofilizada (Valor asignado por NWLMDRL)

BCR: *European Community Bureau of Reference*; CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*; CRM: *Certified Reference Material*; D: densidad; HDL: lipoproteínas de alta densidad; IFCC: *Federación Internacional de Química Clínica*; LDL: lipoproteínas de baja densidad; NIST: *National Institute of Standards and Technology*; NWLMDRL: *Northwest Lipid Metabolism and Diabetes Research Laboratories*; OMS: *Organización Mundial de la Salud*; SRM: *Standard Reference Materials*; UC: ultracentrifugación.

los laboratorios clínicos deben exigir a la industria del diagnóstico *in vitro* la información sobre la trazabilidad metrológica de los valores asignados a sus materiales de calibración. Además, los organizadores de los programas de evaluación externa de la calidad deberían proporcionar los valores obtenidos por los métodos de referencia en las mezclas utilizadas como material de control de calidad externo¹⁵.

Métodos definitivos y de referencia

La correcta estandarización de las determinaciones de lípidos y lipoproteínas requiere de la existencia de unos métodos recomendados validados frente a un procedimiento de medición definitivo o de referencia con el empleo de materiales de referencia primarios o secundarios adecuados y lo suficientemente estables¹⁶. En la [tabla 4](#) se resumen los procedimientos de medición de referencia, definitivos y recomendados para la cuantificación de lípidos y lipoproteínas.

Colesterol

El colesterol total es un analito claramente definido, y que existe en el plasma de forma libre y esterificada; sin embargo, para su análisis las formas esterificadas son previamente hidrolizadas, de tal manera que la medición del colesterol total, así como moléculas de colesterol libre, puede ser definida sin ambigüedades¹. Para el colesterol el método de referencia es una modificación del método de Abell-Kendall, aunque ha sido propuesto un método de cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) con dilución isotópica²⁶. Dicho método modificado de Abell-Kendall (CDC) se basa en la liberación del colesterol en forma de éster contenido en la muestra de suero por saponificación con hidróxido de potasio alcohólico²⁷; a continuación se extrae con hexano y se evapora una alícuota del extracto, desarrollándose un cromóforo a 620 nm con el reactivo de Liebermann-Burchard (anhídrido acético, ácido

acético glacial y ácido sulfúrico concentrado). Este método de referencia se calibra con el material de referencia NIST SRM 911c, siendo trazable al método definitivo de dilución isotópica-espectrometría de masas (ID-MS) (*National Institute of Standards and Technology* [NIST]).

Triglicéridos

Para los triglicéridos, el NIST considera el método de espectrometría de masas-dilución isotópica (ID-MS) como método definitivo, y ha sido propuesto como de referencia²⁸. Para llevarlo a cabo es preciso diluir previamente la muestra de suero con ¹³C₃-glicerol marcado isotópicamente; a continuación se mezclan y se hidrolizan con alcohol/KOH a 60 °C durante 1 h, y seguidamente el disolvente se evapora bajo nitrógeno y el residuo que queda, que contiene glicerol libre e hidrolizado, se derivatiza con anhídrido acético en presencia de piridina. Seguidamente, este producto se extrae con acetato de etilo, y la capa orgánica se extrae y se seca bajo nitrógeno a 60 °C. Por último, este derivado de acetato de glicerol se reconstituye en metanol y se analiza mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). Por su parte, el método de referencia del CDC precisa de la extracción con ácido silícico, cloruro de metileno y ácido cromotrópico.

Colesterol de LDL y colesterol de HDL

Las principales lipoproteínas, al tratarse de partículas complejas, heterogéneas y dispersas, y con unos rangos de densidades que a veces se solapan, no han sido caracterizadas por completo, por lo que resulta muy difícil definir cuál es la fracción de interés para desarrollar un método de referencia para su medición. Por ello, para la medición de las concentraciones de colesterol en las lipoproteínas (colesterol de LDL, colesterol de HDL, colesterol de lipoproteínas de muy baja densidad [VLDL], colesterol de lipoproteínas de densidad intermedia [IDL] y colesterol de Lp(a)) no existe ningún método aprobado y validado como procedimiento de medición definitivo, aunque sí existe como método de referencia.

Tabla 4 Métodos definitivos, de referencia y recomendados para la medición de lípidos y lipoproteínas

	Método definitivo	Método de referencia	Método recomendado
Colesterol	ID-MS (NIST)	Abell Kendall (CDC)	Enzimáticos
Triglicéridos	ID-MS (NIST)	Extracción con: ácido silícico, cloruro de metileno y ácido cromotrópico (CDC)	Enzimáticos
Colesterol de HDL	No establecido	UC/heparina-Mn2 y Abell Kendall (CDC)	Homogéneos (directos)
Colesterol de LDL	No establecido	UC/precipitación Polianiones (LRC-BQ)	Fórmula Friedewald (si Tg < 200 mg/dL); LRC-BQ, o c-LDL directo certificado (si Tg ≥ 200 mg/dL)
Apolipoproteína A1	HPLC-MS	No establecido	Inmunonefelometría
Apolipoproteína B	No establecido	No establecido	Inmunoturbidimetría
Lipoproteína (a)	No establecido	Método ELISA (candidato por consenso)	Inmunonefelometría Inmunoturbidimetría

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*; ELISA: análisis de inmunoabsorción ligado a las enzimas; HDL: lipoproteínas de alta densidad; HPLC-MS: cromatografía líquida de alta resolución con espectrometría de masas; ID-MS: espectrometría de masas con dilución isotópica; LDL: lipoproteínas de baja densidad; LRC-BQ: *Lipid Research Clinic* - beta cuantificación; NIST: *National Institute of Standards and Technology*; Tg: triglicérido; UC: ultracentrifugación.

Para la cuantificación del colesterol de LDL existe un método de referencia, recomendado por el CDC, que se basa en separar primero por ultracentrifugación las VLDL y quilomicrones del resto, para después precipitar con polianiones las LDL, quedando aisladas las HDL. Las mediciones de colesterol en las distintas fracciones se realizan por el método de Abell-Kendall. Finalmente, el colesterol de LDL se obtiene por diferencia. De este modo, en la fracción de LDL así obtenida, tendremos en realidad una mezcla de lipoproteínas. Este método, también conocido como beta cuantificación, mide toda una población de lipopartículas: VLDL residuales, IDL, Lp(a), apo E-HDL, todas ellas consideradas como aterogénicas, y siendo las LDL claramente mayoritarias, si bien la contribución relativa de las lipoproteínas minoritarias puede variar ampliamente entre diferentes individuos, lo que introduce un factor de variabilidad importante.

Para el colesterol de HDL existe un consenso mundial sobre la conveniencia de utilizar el método desarrollado por el CDC (CDC-MR) que mide exclusivamente las HDL2 y HDL3²⁵, como método de referencia para la asignación de los valores de los materiales de referencia²⁹, puesto que ha sido la base de los amplios estudios epidemiológicos y clínicos en los que se fundamentan los valores discriminantes utilizados para la estratificación del riesgo coronario. Como en el caso anterior, el método de referencia separa primero las VLDL y posibles quilomicrones por ultracentrifugación, y precipitando posteriormente con heparina-manganeso se obtienen la HDL aislada en la que se cuantifica el colesterol por el método de Abel-Kendall. La ultracentrifugación se realiza $105.000 \times g$, y densidad de 1,006 g/L, durante 18 h a 18 °C. Se estima que la desviación estándar global del método para el análisis de colesterol de HDL es igual o inferior a 1,5 mg/dL (0,03879 mmol/L).

Por otra parte, para concentraciones de triglicéridos inferiores a 200 mg/dL, se elimina la necesidad de la ultracentrifugación¹.

Apolipoproteínas A1 y B, y Lp(a)

Hasta el momento no se han establecido métodos de referencia para apo A1 ni para apo B. Para la apo A1 se ha establecido un método definitivo basado en cromatografía líquida de alta resolución con espectrometría de masas (HPLC-MS), no así para la apo B, para la que no existe tampoco método definitivo.

Tampoco existe actualmente un método recomendado o que pueda ser considerado como de referencia para la medición de la concentración de Lp(a), debido a los problemas ocasionados por la variabilidad interindividual de la estructura de la apolipoproteína, aún no resueltos. Es necesario el desarrollo de futuras líneas de investigación que permitan solucionar la estandarización de su medición en plasma/suero³⁰, habiéndose apuntado también hacia el número de partículas, y a la necesidad de desarrollar una prueba capaz de medirlas independientemente de la masa total de Lp(a)³¹, sobre la base del hallazgo de anticuerpos cuya inmunorreactividad frente a todas las isoformas de la apolipoproteína sea igual, de la disponibilidad de métodos precisos, y de la estandarización de todo el proceso³⁰.

Aunque no existe un método definitivo para la medición de Lp(a), se ha propuesto como de referencia por el grupo de trabajo para la estandarización de la Lp(a) de la IFCC, un método ELISA que utiliza un anticuerpo monoclonal específico contra el epítipo único presente en el KIV tipo 9 (mAb40), que está consensuado como método propuesto de referencia para la preparación de material de referencia secundario³¹.

Métodos recomendados

En la [tabla 4](#) se recogen los métodos recomendados que se aplican en la práctica diaria en los laboratorios clínicos. Deben ser procedimientos lo suficientemente practicables como para alcanzar los objetivos analíticos propuestos ([tablas 1 y 2](#)) y comparables con los empleados, en su día, para establecer las bases epidemiológicas y definir el riesgo cardiovascular.

Colesterol

En los laboratorios clínicos se recomienda utilizar métodos enzimáticos que, en la práctica totalidad de las distintas versiones que proporcionan los fabricantes, están basados en la utilización de las enzimas: colesterol-esterasa, colesterol-oxidasa y peroxidasa (con la secuencia de reacciones que se describen en la [figura 1A](#)), con lectura final de absorbancias en longitudes de onda de 500 nm, y aplicación de la ley de Lambert-Beer.

Triglicéridos

Para la concentración de triglicérido se recomienda utilizar métodos enzimáticos. Los triglicéridos se hidrolizan, y se calcula su concentración en función del contenido en glicerol en la muestra final (cuantifican la medición de glicéridos totales como triglicérido), para lo cual debe tenerse en cuenta el posible contenido en glicerol de la muestra antes de la hidrólisis; por esta razón algunos métodos incluyen una valoración del glicerol libre inicial, el cual restan del glicerol total antes de dar el resultado final. Como en el caso del colesterol, los distintos métodos disponibles en el mercado tienen los mismos fundamentos, pudiendo diferenciar únicamente entre los que efectúan corrección por el glicerol libre y los que no lo hacen. La práctica totalidad de los métodos están basados en la utilización de las enzimas: lipasa, glicerol quinasa, glicerol-3-fosfato oxidasa y peroxidasa, con la secuencia de reacciones que se describen en la [figura 1B](#), y lectura final de absorbancias en longitudes de onda de 500 nm, y aplicación de la ley de Lambert-Beer.

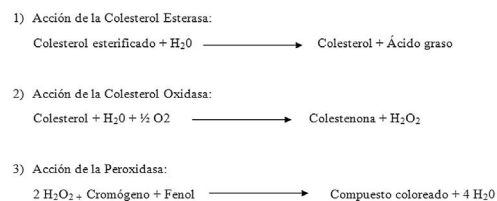
Colesterol de LDL

En los laboratorios clínicos la forma rutinaria de determinación de colesterol LDL es mediante la fórmula de Friedewald, que funciona razonablemente bien siempre y cuando la concentración de triglicérido sea inferior a 200 mg/dL. Cuando se supera dicha concentración de triglicérido, no se debe hacer uso de dicha fórmula para el cálculo de LDL, sino utilizar en su lugar el colesterol-no-HDL o la apo B.

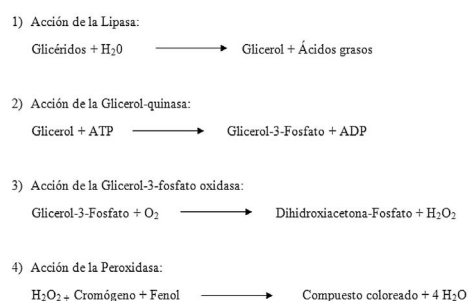
Colesterol de HDL

Los métodos recomendados para la medición rutinaria de colesterol HDL en el laboratorio clínico son los métodos homogéneos suficientemente contrastados. En la [tabla 5](#) se exponen los métodos patentados, todos ellos recomendables, que han sido adaptados a distintos autoanalizadores, y cuyas respectivas reacciones químicas aparecen en la [figura 1C](#).

A. Reacciones del método recomendado para la cuantificación de colesterol



B. Reacciones del método recomendado para la cuantificación de triglicérido



C. Reacciones de los métodos recomendados para la cuantificación del cHDL (*)

Enzimas modificadas con PEG (Kiowa Medex Company)		
1. Qm, VLDL, LDL + α -ciclodextrina + MgCl_2	$\longrightarrow$	complejos solubles de Qm, VLDL, LDL
2. EC-HDL + H_2O	$\xrightarrow{\text{PEG-CE}}$	colesterol HDL + RCOOH
Colesterol HDL + O_2	$\xrightarrow{\text{PEG-CO}}$	Δ^4 -colecstenona + H_2O_2
3. $2\text{H}_2\text{O}_2$ + 4-aminoantipirina /peroxidasa	$\longrightarrow$	desarrollo de color
Polímero sintético/detergente (Daichii Pure Chemicals Co.)		
1. Qm, VLDL, LDL + polímero sintético	$\longrightarrow$	complejos solubles de Qm, VLDL, LDL
2. Colesterol HDL	$\xrightarrow{\text{CE} + \text{CO}}$	Δ^4 -colecstenona + H_2O_2
3. H_2O_2 + 4-aminoantipirina /peroxidasa	$\longrightarrow$	desarrollo de color
Inmunológico (Wako Pure Chemicals Industry)		
1. Qm, VLDL, LDL + antic anti-apoB	$\longrightarrow$	complejos solubles de Qm, VLDL, LDL
2. Colesterol HDL + H_2O + O_2	$\xrightarrow{\text{CE} + \text{CO}}$	Δ^4 -colecstenona + H_2O_2
3. H_2O_2 + 4-aminoantipirina /peroxidasa	$\longrightarrow$	desarrollo de color
De la catalasa (Denka Seiken Co.)		
1. Qm, VLDL, LDL	$\xrightarrow{\text{CE} + \text{CO}}$	Δ^4 -colecstenona + H_2O_2
2. $2\text{H}_2\text{O}_2$ + catalasa	$\longrightarrow$	$2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
3. HDL + inhibidor catalasa	$\longrightarrow$	Δ^4 -colecstenona + H_2O_2
4. H_2O_2 + 4-aminoantipirina /peroxidasa	$\longrightarrow$	desarrollo de color

Figura 1 A) Reacciones del método recomendado para la cuantificación de colesterol. B) Reacciones del método recomendado para la cuantificación de triglicérido. C) Reacciones de los métodos recomendados para la cuantificación del cHDL (*).

CE: colesterol esterasa; CO: colesterol oxidasa; PEG: polietilenglicol; Qm: quilomicrones. (*) Tomado de Aguilar Doreste y Vella Ramírez³².

Tabla 5 Procedimientos recomendados para la medición de apolipoproteínas A1 y B, y Lp(a)

	Procedimientos		
	Inmunoturbidimetría	Inmunonefelometría	
		Punto final	Cinética
Fundamento general	Formación de inmunocomplejos con el anticuerpo dirigido contra la proteína a medir		
Fundamento específico	Medición de la difracción de la luz en un ángulo determinado, alterada por los inmunocomplejos formados	Medición de la difracción de la luz en un ángulo determinado, alterada por los inmunocomplejos formados	Medición del cambio de la velocidad de emisión de la luz dispersada, en función de la velocidad de formación de los inmunocomplejos
Anticuerpos		Anti-apo A1 (apo A1) Anti-apo B (apo B) Anti-Lp(a) (Lp(a))	

apo A1: apolipoproteína A1; apo B: apolipoproteína B; Lp(a): lipoproteína (a).

Apolipoproteínas A1 y B, y Lp(a)

Para la medición de ambas apolipoproteínas en la rutina de los laboratorios clínicos se recomienda emplear métodos inmunonefelométricos e inmunoturbidimétricos, que cumplan con los criterios que señalan la OMS y la IFCC^{1,19}.

Los métodos inmunonefelométricos, lo mismo que los inmunoturbidimétricos, emplean anticuerpos anti-apo A1, anti-apo B y anti-Lp(a), y tienen análogos fundamentos para las tres determinaciones mencionadas, con pequeñas variaciones que tienen que ver con la forma de detección del complejo que sirve de base para el análisis, tal y como se expone en la [tabla 5](#).

Limitaciones y debilidades

Debe tenerse siempre en cuenta que al realizar determinaciones de colesterol relacionado con una familia de lipoproteínas concreta (LDL, HDL), estamos cuantificando determinadas lipopartículas cuya contribución específica puede variar en función de la metodología utilizada. Por este motivo, es recomendable utilizar los procedimientos que han aportado los resultados constituyentes de las bases de datos epidemiológicas y clínicas mencionadas y no utilizar métodos que no se sabe qué es lo que miden, o que no hayan demostrado una clara transferibilidad de los resultados a los obtenidos con los métodos de referencia.

La definición de un material de referencia primario para las LDL, lo mismo que para las HDL, resulta extremadamente difícil debido a que, tanto a nivel individual como entre la totalidad de los pacientes, existe una gama heterogénea de partículas que varían en su contenido en colesterol, y que exhiben distintas propiedades físicas (densidad, tamaño, movilidad electroforética)¹.

Hasta hace relativamente poco tiempo, la cuantificación del colesterol de HDL se realizaba casi exclusivamente por métodos de precipitación, mediante ensayos que requieren

un paso de separación manual con reactivos precipitantes, seguido del análisis del contenido en colesterol en analizadores. La necesidad de mejorar la precisión de los métodos, así como la contención del coste en los laboratorios clínicos, tuvo como consecuencia el desarrollo de una generación de métodos completamente automatizados, los llamados «métodos homogéneos», que emplean reactivos específicos para, con criterio selectivo, medir directamente el colesterol de HDL. Cada laboratorio debe, por tanto, considerar una serie de factores técnicos y económicos para seleccionar el método que mejor se adapte a su situación³².

Respecto a los métodos directos para la medición del colesterol de HDL, todos los métodos actualmente disponibles, inicialmente desarrollados por fabricantes japoneses, fueron certificados por el CRMLN. La mayoría fueron posteriormente vendidos a otros fabricantes para su distribución. Por esta razón, aunque todos los sistemas reactivos primarios tienen certificación CRMLN, estarían en principio preparados para cada analizador y sistema de calibración en concreto, por lo que su aplicación universal a todas las versiones, todos los equipos, y todos los lotes de reactivos, no siempre estaría garantizada. Ante esta situación, se aconseja confirmar la exactitud de cada nuevo lote de calibradores llevando a cabo estudios de solapamiento con los lotes empleados previamente¹, pues aunque la mayoría de los métodos directos concuerdan bien con los objetivos de error del NCEP para sujetos en ayunas y sin lipoproteínas alteradas³³, todos ellos fallan al intentar los mismos objetivos con pacientes dislipidémicos, debido a la falta de selectividad hacia las lipoproteínas anormales³⁴, lo que conduce a valores incorrectos del colesterol de LDL calculado por cualquiera de las cuatro ecuaciones disponibles para ello³⁵.

De forma similar a lo acontecido con el colesterol de HDL, la aparición de varios métodos directos (homogéneos) para la cuantificación automática de colesterol de LDL, sin separación previa de lipoproteínas, ha hecho que un número

creciente de laboratorios pase a utilizar métodos homogéneos para medir colesterol LDL, en muchos casos limitándolo a las muestras en las que no es recomendable emplear la ecuación de Friedewald, por su elevada concentración de triglicéridos.

Debido a las limitaciones de estos métodos directos, su utilización no es frecuente en los laboratorios, empleándose en su lugar el colesterol-no-HDL cuando la concentración de triglicérido es superior a 200 mg/dL.

Los fabricantes que han desarrollado estos métodos homogéneos para colesterol de LDL han certificado sus productos a través de la CRMLN, y han demostrado que sus medidas pueden confluír con las recomendaciones de trabajo del NCEP para exactitud y precisión, aunque solamente cuando se utilizan muestras de pacientes en ayunas y sin presencia de lipoproteínas atípicas, ya que todos los métodos fallan a la hora de estudiar sujetos con patologías en las que aparecen lipoproteínas anormales³⁴.

Se aconseja, como en el caso de las pruebas homogéneas para colesterol de HDL, confirmar la exactitud de cada nuevo lote de calibradores llevando a cabo estudios de solapamiento con los lotes empleados previamente¹, pero con la mayoría de los métodos directos disponibles no se consigue mejorar la clasificación del riesgo cardiovascular, salvo para muestras hipertriglicéridémicas³⁵, lo que ha llevado a sugerir el empleo del colesterol-no-HDL o de la apo B^{1,35,36}. Por otra parte, los fallos de las ecuaciones para calcular el colesterol de LDL a partir de otras magnitudes han hecho surgir: planteamientos sobre una posible ecuación óptima³⁷, propuestas de nuevas fórmulas³⁸, e incluso de medida del número de partículas de LDL en lugar del colesterol contenido en ellas³⁹, sobre la base de que el número de partículas de LDL se correlacionará más estrechamente con la concentración de apo B, dado que cada partícula de LDL contiene una sola molécula de dicha proteína. Este último planteamiento se ha apuntado también para la determinación de colesterol HDL, sugiriendo la medida del número de partículas de HDL, en lugar de la concentración de colesterol de HDL⁴⁰.

Finalmente, deben extremarse las precauciones cuando se están llevando a cabo estudios a largo plazo, ya sean epidemiológicos o ensayos clínicos, con especial atención a la posible falta de especificidad para los especímenes atípicos, a la falta de información sobre los efectos de congelar las muestras, así como a los cambios por parte de los fabricantes en la elaboración de los reactivos que pueden afectar a los resultados de estos estudios de investigación a largo plazo¹⁶.

Recomendaciones

Las mediciones de la concentración de los diversos componentes del metabolismo lipídico son críticas, ya que los valores obtenidos en las mismas pueden influir en la toma de decisiones clínicas, incluso en ausencia de síntomas de enfermedad, de instauración crónica de algún tipo de intervención con todas las implicaciones económicas y sanitarias que ello supone. Además, es considerable la proporción de población potencialmente implicada en esta toma de decisiones con fines preventivos.

Por todo lo expuesto, se recomienda lo siguiente:

Recomendación 1. En la práctica diaria el laboratorio clínico debe utilizar, para la medición de las concentraciones de lípidos y lipoproteínas, métodos recomendados validados frente a un método de referencia o definitivo, y debe emplear material de control adecuado que cumpla con lo previsto sobre trazabilidad con los sistemas de referencia por la Directiva Europea sobre Diagnóstico *in vitro* (EC IVDD 98/79/EC).

Recomendación 2. Los métodos recomendados deben ser lo suficientemente practicables como para poder alcanzar con ellos un error de medida inferior al 10%¹⁰, y cuando ello no fuera posible, conseguir los objetivos analíticos recomendados por el NCEP y los mínimos elaborados por la SEQC^{ML2,20}. En cualquier caso, los objetivos de calidad deben ajustarse a los expuestos en la [tabla 2](#).

Recomendación 3. La determinación de colesterol de HDL por métodos homogéneos en equipos automatizados resulta aceptable para la práctica rutinaria, en el sentido de que cumplen los requisitos mínimos como para garantizar una adecuada valoración del riesgo cardiovascular. Se recomienda realizar la medición de colesterol HDL mediante métodos homogéneos en equipos automatizados ([fig. 1C](#)).

Recomendación 4. Para la cuantificación de la concentración de colesterol de LDL se recomienda el uso de la fórmula de Friedewald, siempre y cuando las muestras no tengan una concentración de triglicérido superior a 200 mg/dL (2,3 mmol/L). No se recomienda, por el momento, la utilización de métodos homogéneos directos para la medición de colesterol LDL.

Recomendación 5. La utilización del colesterol-no-HDL, y también de la apo B, pueden ser de gran utilidad en muestras hipertriglicéridémicas en la rutina de los laboratorios clínicos, ya que los métodos directos disponibles no consiguen distinguir bien cada fracción lipoproteica, y no mejoran la valoración del riesgo cardiovascular. Se recomienda informar de la concentración de colesterol-no-HDL en aquellos casos en los que la estimación de la concentración de colesterol de LDL no se pueda realizar debido a la elevada concentración de triglicéridos (> 2,3 mmol/L o 200 mg/dL).

Recomendación 6. Los métodos recomendados para la cuantificación rutinaria de apo A1 y apo B en el laboratorio clínico son la inmunonefelometría y la inmunoturbidimetría, siempre que los calibradores sean trazables a materiales de referencia internacionales (OMS/IFCC SP1-01 y OMS/IFCC SP3-07). Para la cuantificación de Lp(a) se recomienda igualmente la inmunonefelometría e inmunoturbidimetría.

Recomendación 7. La cuantificación de colesterol y triglicérido en suero y plasma se recomienda realizarla mediante métodos enzimáticos automatizados, que son el método de la colesterol esterasa/colesterol oxidasa/peroxidasa, y el de la lipasa/glicerol quinasa/glicerol-3-fosfato oxidasa/peroxidasa, respectivamente ([fig. 1](#)).

Bibliografía

1. Warnick GR, Kimberly MM, Waymack PP, Leary ET, Myers GL. Standardization of measurements for cholesterol, triglycerides, and major lipoproteins. *Lab Med.* 2008;39:481-90.
2. Ricós Aguilá C, Álvarez Funes V, Jiménez Gutiérrez CV, Hernández Gómez A, Minchinela Girona J. Transferibilidad de los resultados producidos en el laboratorio clínico Comité de

- Garantía de la Calidad y Acreditación de Laboratorios. Sociedad Española de Química Clínica y Patología Molecular. *Quím Clín*. 1996;15:442-4.
3. Nelson RH. Hyperlipidemia as a risk factor for cardiovascular disease. *Prim Care*. 2013;40:195-211.
 4. Adhyaru BB, Jacobson TA. New cholesterol guidelines for the management of atherosclerotic cardiovascular disease risk: a comparison of the 2013 American College of Cardiology/American Heart Association cholesterol guidelines with the 2014 National Lipid Association recommendations for patient centered management of dyslipidemia. *Cardiol Clin*. 2015;33:181-96.
 5. Grundy SM, Becker D, Clark LT, Cooper RS, Denke MA, Howard WJ, et al., National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002;106:3143-421.
 6. Perk J, de Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren WM, et al., European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012): the Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur J Prev Cardiol*. 2012;19:585-667.
 7. Catapano AL, Reiner Z, de Backer G, Graham I, Taskinen MR, Wiklund O, et al. Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Atherosclerosis*. 2011;217 Suppl. 1:S1-44.
 8. Perk J, de Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren M, et al. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur Heart J*. 2012;33:1635-701.
 9. Stone NJ, Robinson J, Lichtenstein H, Baireg CN, Blum CB, Eckel RH, et al. 2013 ACC/AHA Guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014;129 Suppl. 2:S1-45.
 10. Naito HK, Hutchison JD, Bowers GN, Bailie EE, Joseph JM, Myers GL, et al. Current status of blood cholesterol measurement in clinical laboratories in the United States: a report from the Laboratory Standardization Panel of the National Cholesterol Education Program. *Clin Chem*. 1988;34:193-201.
 11. Bachorik PS, Ross JW. National Cholesterol Education Program Recommendations for low-density lipoprotein cholesterol: executive summary. *Clin Chem*. 1995;41:1414-20.
 12. Stein EA, Myers GL. National Cholesterol Education Program Recommendations for triglyceride measurement: executive summary. *Clin Chem*. 1995;41:1321-426.
 13. Warnick GR, Wood PD. National Cholesterol Education Program Recommendations for measurement of high-density lipoprotein cholesterol: executive summary. *Clin Chem*. 1995;41:1427-33.
 14. Grundy SM, Becker D, Clark LT, Cooper RS, Denke MA, Howard WJ, et al., Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001;285:2486-97.
 15. Cooper GR, Smith SJ, Myers GL, Sampson EJ, Magid E. Estimating and minimizing effects of biological sources of variation by relative range when measuring the mean of serum lipids and lipoproteins. *Clin Chem*. 1994;40:227-32.
 16. Rifai N, Dufour DR, Cooper GR. Preanalytical variation in lipid, lipoprotein, and apolipoprotein testing. En: Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH, editores. *Handbook of lipoprotein testing*. AACC Press: Washington, DC; 2000. p. 161-87.
 17. Aguilar Doreste JA, Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Comisión de lipoproteínas y enfermedades vasculares. Protocolo para la estandarización de la fase preanalítica en la medición de lípidos y lipoproteínas. *Quím Clín*. 2004;23:137-40.
 18. Miller WG. Matrix effects in the measurement and standardization of lipids and lipoproteins. En: Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH, editores. *Handbook of lipoprotein testing*. 2nd ed Washington, DC: AACC Press; 2000. p. 695-716.
 19. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Characterization and qualification of commutable reference materials for laboratory medicine; proposed guideline. CLSI document C-53P. Wayne, PA: CLSI; 2008.
 20. Ricós C, Álvarez V, Cava F, García-Lario JV, Hernández A, Jiménez CV, et al. Current databases on biological variation: pros and progress. *Scand J Clin Lab Invest*. 1999;59:491-500.
 21. Moranchó J, Prada E, Gutierrez-Bassini G, Salas A, Blazquez R, Jou JM, et al. Actualización de las especificaciones de la calidad analítica 2014. Consenso de las Sociedades Científicas nacionales. *Rev Lab Clin*. 2014;7:3-8.
 22. Myers GL, Kimberly MM, Waymack PP, Smith SJ, Cooper, Sampson EJ. A reference method laboratory network for cholesterol: a model for standardization and improvement of clinical laboratory measurements. *Clin Chem*. 2000;46:1762-72.
 23. Gómez-Gerique JA, Fenollar Cortés M. Recomendaciones para la medición de las magnitudes del perfil lipídico en la fase analítica. *Quím Clín*. 2005;24:172-6.
 24. 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.
 25. Myers GL, Cooper GR, Henderson LO, Hassemer DJ, Kimberly MM. Standardization of lipid and lipoprotein measurement. En: Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH, editores. *Handbook of lipoprotein testing*. Washington: AACC Press; 2000. p. 717-48.
 26. Edwards SH, Kimberly MM, Pyatt SD, Stribling SL, Dobbin KD, Myers GL. Proposed serum cholesterol reference measurement procedure by gas chromatography-isotope dilution mass spectrometry. *Clin Chem*. 2011;57:614-22.
 27. 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;195:357-66.
 28. Edwards SH, Stribling SL, Pyatt SD, Kimberly MM. Reference measurement procedure for total glycerides by isotope dilution GC-MS. *Clin Chem*. 2012;58:768-76.
 29. Okamoto Y, Tanaka S, Nakano H. Direct measurement of HDL cholesterol is preferable to precipitation method. *Clin Chem*. 1995;41:1784.
 30. Esteban Salán M, Aguilar Doreste JA, Gómez Gerique JA, Romero Román C, Castro Castro MJ, Calmarza Calmarza P, et al., Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Comisión de Lipoproteínas y Enfermedades Vasculares. Lipoproteína (a): factor de riesgo emergente de enfermedad cardiovascular. Documentos de la SEQC. 2013:39-46.
 31. McConnell JP, Guadagno PA, Dyspring TD, Hoefner DM, Thiselton DL, Warnick R, et al. Lipoprotein (a) mass: a massively misunderstood metric. *J Clin Lipidol*. 2014;8:550-3.

32. Aguilar Doreste JA, Vella Ramírez JC, Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Comisión de Lipoproteínas y Enfermedades Vasculares. Actualización de los métodos para la medición de la concentración de colesterol HDL en suero. Documentos de la SEQC. 2011;6–11.
33. Miller WG, Myers GL, Sakurabayashi I, Bachmann LM, Caudill SP, Dziekonski A, et al. Seven direct methods for measuring HDL and LDL cholesterol compared with ultracentrifugation reference measurement procedures. *Clin Chem*. 2010;56: 977–86.
34. Oliveira MJ, van Deventer HE, Bachmann LM, Warnick GR, Nakajima K, Nakamura M, et al. Evaluation of four different equations for calculating LDL-C with eight different direct HDL-C assays. *Clin Chim Acta*. 2013;423:135–40.
35. Deventer HE, Miller WG, Myers GL, Sakurabayashi I, Bachmann LM, Caudill SP, et al. Non-HDL cholesterol shows improved accuracy for cardiovascular risk score classification compared to direct or calculated LDL cholesterol in a dyslipidemic population. *Clin Chem*. 2011;57:490–501.
36. Contois JH, Warnick GR, Sniderman AD. Reliability of low-density lipoprotein cholesterol, non-high-density lipoprotein cholesterol, and apolipoprotein B measurement. *J Clin Lipidol*. 2011;5:264–72.
37. Stein EA. Measuring LDL-cholesterol: for old and new calculations, is there an optimal formula? *Clin Chem*. 2014;60: 1466–8.
38. Meeusen J, Lueke AJ, Jaffe AS, Saenger AK. Validation of a proposed novel equation for estimating LDL cholesterol. *Clin Chem*. 2014;60:1519–23.
39. Master SR, Rader DJ. Beyond LDL cholesterol in assessing cardiovascular risk: apo B or LDL-P? *Clin Chem*. 2013;59:723–5.
40. Davidson WS. HDL-C vs HDL-P: how changing one letter could make a difference in understanding the role of high-density lipoprotein in disease. *Clin Chem*. 2014;60:e1–3.