

# Detección de un error sistemático constante en un procedimiento directo de medida del colesterol de las lipoproteínas de baja densidad

Rafael Caballero Sarmiento

Laboratorio. CAP Manso. Barcelona. España.

---

En el trabajo habitual de nuestro laboratorio de asistencia primaria, se determina el colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (cLDL) directamente, con equipo suministrado por Olympus España y creado por WAKO, en pacientes cuyos triglicéridos son > 400 mg/dl. Movidos por una revisión de la bibliografía sobre este método y no disponiendo de medios (ultracentrífuga) para estudiar la posible inespecificidad que se cita en la bibliografía, hemos recurrido a medir con dicho método el cLDL de pacientes con triglicéridos ≤ 200 mg/dl, a los que, al aplicar la fórmula de Friedewald, su resultado de LDL sería más transferible con la ultracentrifugación. Hemos detectado un error sistemático constante del LDL directo frente al calculado y, por métodos estadísticos, hemos llegado a la conclusión de que ese error sistemático constante se debe a que el reactivo Olympus mide, inespecíficamente, el colesterol de las lipoproteínas de muy baja densidad. Creemos que estos datos son importantes para los usuarios de este reactivo, tanto como la pronta respuesta a las dos preguntas que se plantean al final del estudio.

*Palabras clave:*

Método directo. Colesterol de las lipoproteínas de baja densidad. Cálculo. Beta-quantificación.

---

## CONSTANT SISTEMATIC ERROR DETECTED IN A DIRECT ASSAY FOR MEASUREMENT OF LDL-CHOLESTEROL

In our primary care laboratory, we routinely perform the direct low density lipoprotein (LDL) cholesterol test, supplied by Olympus España and created by WAKO, in patients with triglyceride levels of > 400 mg/dl. Studies in the literature have reported systematic error when this method is used. Because an ultracentrifuge was not available to study the possible lack of specificity reported in the literature, we used this test to measure LDL cholesterol in patients with triglyceride levels of ≤ 200 mg/dl in whom, on applying the Friedewald formula, the results for LDL cholesterol would be more concordant with those obtained by ultracentrifugation. We detected a constant systematic error in the direct LDL cholesterol test versus Friedewald calculation and, using statistical methods, we concluded that this constant systematic error is due to the fact that the Olympus reagent measures, nonspecifically, VLDL cholesterol. We believe that users of this reagent should be aware of these data and that a rapid response should be given to the two questions posed at the end of the study.

*Key words:*

Direct method. Low density lipoprotein cholesterol. Calculation. Beta-quantification.

---

Correspondencia: Dr. R. Caballero Sarmiento.  
Bailén, 37, 4.º 1.ª. 08010 Barcelona. España.  
Correo electrónico: 19481rcs@comb.es

Recibido el 29 de mayo de 2006 y aceptado el 3 de julio de 2006.

La asociación entre el colesterol total y la enfermedad coronaria fue demostrada en estudios prospectivos como el de Framingham<sup>1</sup>. La mayoría del colesterol total es transportado en la circulación general por las lipoproteínas de baja densidad

(LDL), que han demostrado ser la principal causa, cuantitativa y/o cualitativamente, del riesgo de enfermedad isquémica. Las últimas indicaciones del National Cholesterol Education Program (NCEP-ATP III) dan más importancia, en esta versión, a la prevención primaria de la cardiopatía isquémica. Los estudios en pacientes sin cardiopatía isquémica, pero en tratamiento para reducir el colesterol de las LDL (cLDL), han demostrado claramente la eficacia de esa reducción en la prevención primaria de la enfermedad coronaria<sup>2,3</sup>.

Ante la imposibilidad de medirlo en centros no especializados (y que, por tanto, no disponen de la técnica de referencia para medir cLDL: ultracentrifugación secuencial o su forma abreviada, la betacuantificación), Friedewald desarrolló en 1972 una fórmula<sup>4</sup> para estimar la concentración de cLDL en plasma, indicando su validez hasta una cifra de triglicéridos de 400 mg/dl (4,5 mmol/l). No obstante, se ha demostrado<sup>5,6</sup> que en las muestras con cifras de triglicéridos hasta 200 mg/dl (2,26 mmol/l) se consigue la mejor transferibilidad entre los resultados de la ecuación y los de la betacuantificación: un 86-92% de los valores de cLDL se diferencian en menos del 10%, mientras que en muestras con triglicéridos en 200-300 mg/dl (3,4 mmol/l) y 300-400 mg/dl (4,5 mmol/l), ese porcentaje de acuerdo disminuye al 75 y el 61%, respectivamente.

Para suplir los inconvenientes de la betacuantificación y la fórmula de Friedewald, se han desarrollado métodos directos y homogéneos para medir cLDL. Estos métodos facilitan la medida sistemática de cLDL en amplias series de muestras, tal y como requiere actualmente el laboratorio clínico, con porcentajes aceptables de imprecisión e inexactitud. En una publicación del año 2000<sup>7</sup>, a la que se hace referencia en una revisión de 2002<sup>8</sup>, se detectó un error sistemático en las mediciones por el método desarrollado por WAKO. Creímos relevante, tras 6 años de su publicación y haber cambiado en nuestro país la comercialización del citado reactivo, revisar si WAKO había mejorado su reactivo o se seguía detectando ese error sistemático, lo cual hemos hecho con una potencia estadística mayor, y ofrecer, con mayor solidez, una explicación al porqué de ese error sistemático que presentaba el reactivo desarrollado por WAKO.

### Objetivo del estudio

Ensayar la especificidad del método para medir cLDL desarrollado por WAKO (comercializado en nuestro país por Olympus España; referencia OSR6183), para objetivar si el error sistemático en la medida de cLDL, descrito en 2000, existe o ha

sido corregido mediante modificaciones en los reactivos utilizados.

### Material y método

En 109 muestras de suero, se ha medido el colesterol total y el colesterol de la lipoproteínas de alta densidad (cHDL) y se ha calculado el colesterol no HDL (cnoHDL); el cLDL se ha calculado mediante la fórmula de Friedewald ( $cLDL = \text{colesterol total} - [cHDL + \text{triglicéridos}/5]$ ) y se ha medido mediante el método directo desarrollado por WAKO y suministrado en España por Olympus (ref. OSR6183). Todas las mediciones se han hecho en un Olympus 5400. Se seleccionó las 109 muestras por presentar triglicéridos  $\leq 200$  mg/dl (2,26 mmol/l).

El método WAKO para medir cLDL se basa en que, en una primera reacción, un agente protector impide que el cLDL sea degradado por las enzimas colesterol esterasa y colesterol oxidasa, mientras que el cHDL y el de las lipoproteínas de muy baja densidad (cVLDL) se degradan por su acción. El peróxido de hidrógeno generado en esta reacción se descompone por la enzima catalasa. En una segunda reacción, se liberan las LDL de su reactivo protector y mediante acida sódica se inactiva la catalasa; entonces actúan la colesterol esterasa y la colesterol oxidasa sobre el cLDL, y el peróxido de hidrógeno resultante reacciona con la 4-aminoantipirina y desarrolla una coloración azul que se mide espectrofotométricamente.

El tratamiento estadístico de los datos ha sido comparar la medida de cLDL por la fórmula de Friedewald y el método directo mediante el método de Bland-Altman, el coeficiente de correlación intraclase<sup>9</sup> y la regresión no paramétrica de Passing y Bablok.

También se ha estudiado la media de las diferencias entre ambas medidas de cLDL mediante la prueba de la t de Student para datos apareados y se ha cuantificado la diferencia del reactivo de WAKO mediante una regresión lineal simple; se ha intentado encontrar el analito que causaba las diferencias entre el método directo y la fórmula de Friedewald.

### Resultados y discusión

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1.

Todas las mediciones por el método directo produjeron resultados superiores a los valores obtenidos por cálculo, es decir, por encima de la línea del 0 en el método de Bland-Altman (fig. 1).

El coeficiente de correlación intraclase fue de 0,949 y resultó significativo ( $p = 0,0005$ ). Este coeficiente resulta necesario para comprobar el acuerdo de dos métodos de medida, pero no es suficiente. La posible significación de las diferencias entre los resultados de ambos métodos de medida se comprobó con la prueba de la t de Student para datos apareados, que demostró que la diferencia entre la medición directa y la medición calculada de 12,1 mg/dl (0,137 mmol/l) (intervalo de confianza [IC] del 95%, 11,15-13,1 mg/dl) era estadísticamente significativa ( $p = 0,0005$ ). Es decir que, independientemente de su correcta asociación, entre las mediciones de los dos métodos hay un error sistemático significativo. La regresión no paramétrica de Passing y Bablok mostró (fig. 2) una ecuación

**Tabla 1. Datos obtenidos en la muestra de 109 sueros**

	Mínimo	Máximo	Media ± DE
Colesterol	126	294	207,2 ± 34,58
Triglicéridos	40	200	105,00 ± 36,17
cHDL	29	104	60,28 ± 14,32
cnoHDL	82	221	146,93 ± 31,57
cLDL Fórmula	60,8	199,8	125,876 ± 28,71
cLDL Directo	78	208	137,77 ± 28,52
Diferencia cLDL	0,40	23,8	11,89 ± 5,01

cHDL: colesterol de las lipoproteínas de alta densidad; cLDL: colesterol de las lipoproteínas de baja densidad; cnoHDL: colesterol de las lipoproteínas distintas de HDL; DE: desviación estándar.

de regresión tal que:  $cLDL \text{ (directo)} = 0,955 \text{ cLDL Friedewald} + 13,4 \text{ mg/dl}$  (0,15 mmol/l). El IC del 95% de la pendiente (0,955-1,030) incluyó el 1, mientras que el de la ordenada en el origen (8,3-17,6 mg/dl) no incluyó 0; el valor de la ordenada en el origen calculado en la regresión de Passing-Bablok (13,4 mg/dl) fue coincidente con la media de las diferencias de valores (12,1 mg/dl) observada entre ambos métodos. En consecuencia, el análisis estadístico confirmó que el método directo presentaba un error constante (12,1-13,4 mg/dl) en comparación con el cálculo de Friedewald.

Se realizó un análisis de regresión múltiple (método *stepwise*) tomando la diferencia entre las concentraciones de cLDL como variable dependiente y todas las demás variables analizadas como variables predictoras. Las únicas variables significativamente predictoras de las diferencias entre los métodos fueron el cVLDL calculado (coeficiente B = 0,501; IC del 95%, 0,326-0,601) y los valores de cLDL de la fórmula de Friedewald (coeficiente B = -0,595; IC del 95%, -0,85 a -0,34). En el análisis univariado, en cVLDL, calculado como triglicéridos/5, fue una variable predictora, con un coeficiente = 0,43 (IC del 95%, 0,326-0,534). Este coeficiente indica que, por cada mg/dl que aumente el cVLDL calculado (o, lo que es lo mismo, los triglicéridos/5), las diferencias entre las dos mediciones de cLDL aumentarán 0,43 mg/dl (de media).

Al categorizar los valores de cLDL obtenidos por el método directo y por el cálculo de Friedewald de acuerdo con los criterios del NCEP, los primeros sobreestiman el riesgo cardiovascular dependiente de cLDL, al aumentar la categoría de riesgo en el 33% de los casos (tabla 2).

La fórmula de Friedewald utiliza las concentraciones de cHDL y cVLDL como sustrayendo del colesterol total para el cálculo del cLDL. Se ha demostrado que los métodos directos para medir cLDL están exentos de interferencias por cHDL<sup>8</sup>, y en

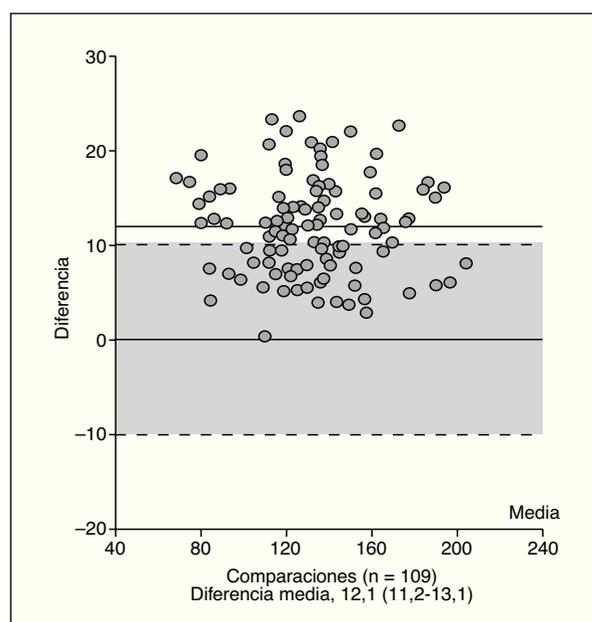


Figura 1. Gráfico de Bland-Altman.

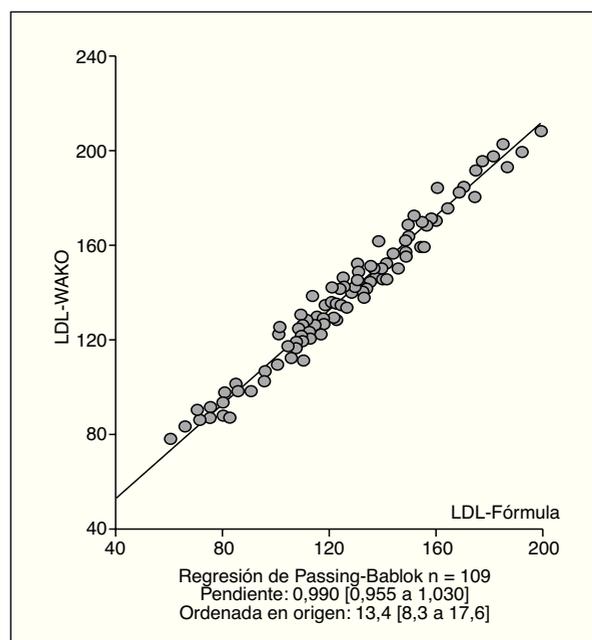


Figura 2. Gráfico de la regresión de Passing-Bablok.

consecuencia, los valores incrementados observados por el método directo respecto a la fórmula de Friedewald estarían en relación con el cVLDL calculado. Este hecho queda demostrado por la dependencia estadística con el cVLDL calculado que el error del método directo muestra. Otras partículas lipoproteínicas con semejanza fisicoquímica con las

**Tabla 2. Categorización de los valores de cLDL según las categorías del NCEP en 109 muestras analizadas por un método directo o por la fórmula de Friedewald**

	cLDL por fórmula de Friedewald (mg/dl)					Total
	< 100	100-130	130-160	160-190	> 190	
LDL directo (mg/dl)						
< 100	12					12
100-130	4	30				34
130-160		19	23			42
160-190			8	6		14
> 190				5	2	7
Total	16	49	31	11	2	109

cLDL: colesterol de las lipoproteínas de baja densidad; NCEP: National Cholesterol Education Program. Los valores de la tabla representan el número de muestras en cada categoría.

LDL, como las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) o Lp(a), podrían ser la causa del error sistemático mostrado por este método directo. Aunque no se ha ensayado la reactividad del método con las partículas IDL, puede asumirse que en las muestras analizadas no las había en una concentración significativa, se trató con muestras de sujetos sin hipertrigliceridemia y la disbetalipoproteinemia es poco frecuente (< 1%) en muestras obtenidas en el análisis de individuos como la población asistida en nuestro centro de salud; respecto a la Lp(a), la cantidad de colesterol transportado en las citadas partículas sólo explicaría un aumento de cLDL de una magnitud como la del error mostrado por el método directo si las concentraciones medias de las muestras analizadas fueran superiores a los 700 mg/l<sup>9,10</sup>. Hay que destacar que la información suministrada por el fabricante del método directo no menciona el efecto de las partículas IDL, aunque algunos autores indican que este método es poco útil para la detección de la hiperlipoproteinemia tipo III<sup>8,11</sup>, ni el de las partículas Lp(a). Los datos obtenidos en el presente trabajo, aparte de demostrar la existencia de un error sistemático en la medida de cLDL por el método en muestras normotriglicéridémicas, plantean incógnitas como qué valores de cLDL se observarían con el método directo en muestras hipertriglicéridémicas o de pacientes diabéticos, con abundancia de partículas VLDL remanentes. Estas preguntas deberán ser contestadas en el futuro mediante la comparación del método di-

recto con el de la ultracentrifugación secuencial o con la betacuantificación.

### Bibliografía

- Gordon T, Kannel WB, Castelli WP, Dawber TR. Lipoproteins, cardiovascular disease and death. The Framingham Study. Arch Intern Med. 1981;141:1128-30.
- The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial results. I. Reduction in incidence of coronary heart disease. JAMA. 1984;251:351-64.
- The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial results. II. The relationship of reduction in incidence of coronary heart disease to cholesterol lowering. JAMA. 1984;251:365-74.
- Friedewald WT, Levy RL, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem. 1972;18: 499-502.
- Warnick GR, Knopp RH, Fitzpatrick V, Branson L. Estimating low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald equation is adequate for classifying patients on the basis of nationally recommended cutpoints. Clin Chem. 1990;36:15-9.
- McNamara JR, Cohn JS, Wilson PW, Schaefer EJ. Calculated values for low-density lipoprotein cholesterol in the assessment of lipid abnormalities and coronary disease risk. Clin Chem. 1990;36:36-42.
- Esteban Salán M, Guimón Bardesi A, De la Viuda Unzueta JM, Azcarate Ania MN, Pascual Usandizaga P, Amoroto del Río E. Analytical and clinical evaluation of two homogeneous assays for LDL-cholesterol in hyperlipidemic patients. Clin Chem. 2000;46: 1121-31.
- Nauck M, Warnick GR, Rifai N. Methods for measurement of LDL-Cholesterol: a critical assessment of direct measurement by homogeneous assays versus calculation. Clin Chem. 2002;48:236-54.
- Delgado M, Llorca J, Doménech JM. Estudios para pruebas diagnósticas y factores pronósticos. Barcelona: Signo; 2005.
- Tate JR, Rifai N, Berg K, Couderc R, Dati F, Kostner GM, et al. International Federation of Clinical Chemistry standardization project for the measurement of lipoprotein(a). Phase I. Evaluation of the analytical performance of lipoprotein(a) assay systems and commercial calibrators. Clin Chem. 1998;44:1629-40.
- Bayer P, Veinverg F, Couderc R, Cherfils C, Cambillau M, Cosson C, et al. Evaluation multicentrique de quatre méthodes de dosage direct du cholestérol -LDL. Ann Biol Clin. 2005;63:27-41.