

HISTORIA DEL METODO

Los antiguos métodos para la determinación de HDL involucraban una ultracentrifugación preparativa. Aun cuando este método ha sufrido varias modificaciones y es considerado el método actual de referencia, sigue siendo tedioso, el procedimiento consume tiempo y se requiere equipo caro y personal altamente capacitado. La electroforesis ha sido utilizada por muchos años para la separación y determinación cualitativa de lipoproteínas pero no ha sido utilizada como una herramienta cuantitativa debido a problemas de estandarización y pobre precisión. Los más recientes métodos de separación involucran el uso de polianiones y cationes divalentes para precipitar lipoproteínas de baja densidad dejando el HDL en el sobrenadante. Algunos de los reactivos usados incluyen: Heparina-Mn; Fosfotungstato de Sodio-Mg; Dextran sulfato y otros. En 1976, Vikari describió un método utilizando polietilén-glicol 6000. Este método ha recibido críticas y ha sido revisado. Izzo et al. describieron modificaciones en el procedimiento original produciendo un método seguro y simple con valores que corresponden a la ultracentrifugación sin las interferencias asociadas a con los otros reactivos. El presente procedimiento está basado en esta modificación.

PRINCIPIO

Cuando el suero se combina con el reactivo de polietilenglicol, todas las proteínas beta (LDL y VLDL) precipitan. La fracción de HDL (fracción alfa) permanece en el sobrenadante. El sobrenadante es entonces tratado como una muestra y ensayado para colesterol por un método enzimático. El valor obtenido es el valor del HDL colesterol.

REACTIVOS

HDL colesterol reactivo precipitante; polietilenglicol en glicina, 20 % p/v, buffer con pH 10.0 (25°C).

El reactivo está listo para usarse.

El reactivo no debe usarse si:

- Aparece sedimento cristalino en el reactivo.
- El reactivo no satisface los parámetros del test.

MATERIAL

- HDL Colesterol reactivo precipitante.
- Reactivo enzimático de colesterol.
- Centrifuga.
- Pipetas automáticas.
- Tubos de ensayo.
- Cronómetro.
- Bloque térmico (37°C).
- Espectrofotómetro capaz de leer a 520 nm.

PROCEDIMIENTO

A.-Separación del HDL Colesterol

1. Identifique los tubos para controles y pacientes.
2. Pipetee 0.5 mL (500 µL) de muestra en los respectivos tubos.
3. Pipetee 0.5 mL (500 µL) de reactivo precipitante en cada tubo y mezcle.
4. Centrifugue a 1000-2000g por 10 minutos.

B.-Determinación del HDL Colesterol

1. Etiquete los tubos: estandar, control, pacientes, etc.
2. Pipetee 1 mL de colesterol reactivo enzimático en cada tubo.
3. Pipetee 0.05 mL (50 µL) de estándar o de sobrenadante obtenido en el punto 4 de la fase A en los respectivos tubos.
4. Incube todos los tubos 10 minutos a 37 °C.
5. Ajuste a 0 el espectrofotómetro con blanco de reactivo a 520 nm.
6. Lea y registre las absorbancias de todos los tubos a 520 nm.
7. Para obtener los valores en mg/dL ver "cálculos".

NOTA

El resultado final de HDL debe ser multiplicado por 2 para compensar la dilución 1:1 de la relación muestra/reactivo precipitante.

CALIBRACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD

La prueba es calibrada con un suero calibrador o un estándar líquido de colesterol (50 mg/dL). Los sueros control con valores conocidos de HDL deben ser corridos rutinariamente para monitorear la validez del procedimiento.

CALCULOS

$$\text{HDL Colesterol mg/dL} = \frac{\text{Abs. Muestra}}{\text{Abs. Std.}} * \text{Conc. std.} * 2$$

Donde 2 es el factor de dilución.

LIMITACIONES

- Los especímenes ictericos o hemolizados no se deben usar porque pueden dar falsos resultados elevados.
- El ácido ascórbico inhibe la determinación del colesterol enzimático.

VALORES ESPERADOS

HDL Colesterol -----30-75 mg/dL

LDL -----66-178 mg/dL

El LDL se puede calcular empleando la siguiente fórmula:

$$\text{LDL} = \text{Colesterol Total} - \text{HDL Colesterol} - \frac{\text{Triglicéridos}}{5}$$

Esta ecuación se maneja solo si el valor de los triglicéridos es menor a 400 mg/dL y el paciente no presenta hiperlipoproteinemia tipo III.

FABRICADO POR:

POINTE SCIENTIFIC, INC.
E.E.U.U.