

COLESTEROL (LÍQUIDO)

Uso:

Para la determinación cuantitativa de colesterol total en el suero.

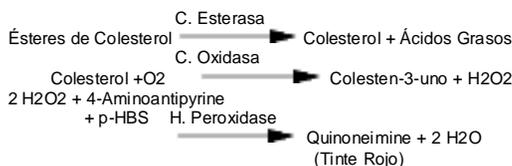
Introducción:

El colesterol es una sustancia grasa que se encuentra en la sangre, bilis y tejido cerebral. Sirve como un precursor de los ácidos biliares, esteroides y vitamina D. La determinación de colesterol en suero es una ayuda importante en el diagnóstico y la clasificación de lipemias.¹ Otras condiciones tales como enfermedades de la tiroides hepática influyen en los niveles de colesterol.² Los métodos enzimáticos han sustituido metodologías más viejas que implican el colesterol esterasa, oxidasa, y el sistema de color trinder. Allain et al. desarrolló una técnica enzimática total en el que se utiliza peróxido de hidrógeno durante la oxidación del colesterol en combinación con peroxidasa, 4-aminoantipirina y fenol para formar un colorante quinoneimina.³ Este reactivo emplea p-hidroxi benceno ácido sulfónico (p-HBS), en lugar de fenol para producir un colorante quinoneimina con mayor absorbancia a 520 nm y un agente tensioactivo para facilitar la finalización de la reacción.

Los resultados obtenidos de esta sustitución son iguales a los resultados obtenidos basándose en la referencia de método de colesterol Abell-Kendall que es recomendado por el CDC.⁶

Principio:

La secuencia de reacción enzimática empleada en la prueba de colesterol es la siguiente:



Los ésteres de colesterol son hidrolizados para producir colesterol. El peróxido de hidrógeno se produce entonces a partir de la oxidación del colesterol por el colesterol oxidasa.

En una reacción acoplada catalizada por la peroxidasa, colorante de color rojo quinoneimina se forma a partir de 4-aminoantipirina, p HBS-y peróxido de hidrógeno. La absorción a 520 nm de la solución de este tinte es proporcional a la concentración de colesterol en la muestra.

Composición del Reactivo:

El reactivo de Colesterol contiene lo siguiente:

4-Aminoantipirina 0.6 mM, Colate de Sodio 8.0 mM, Colesterol Esterasa \geq 150 U/L, Colesterol Oxidasa \geq 150 U/L, Peroxidasa de rábano picante \geq 1,200 U/L, p-hidroxi benceno sulfonato 20 mM, Buffer 125 mM, pH 6.8, ingredientes no-reactivos.

Preparación del Reactivo:

Todos los reactivos vienen en una forma lista para su uso. No se requiere preparación.

Advertencias y Precauciones:

1. Para el uso de diagnóstico in vitro.

PRECAUCIÓN: Los reactivos de diagnóstico in vitro pueden ser peligrosos. Manipular de acuerdo con los procedimientos de laboratorio que determinan evitar la ingestión y el contacto con los ojos o la piel.

2. Las muestras deben ser consideradas infecciosas y manejadas apropiadamente.

Almacenaje y Estabilidad del Reactivo:

Almacena el reactivo a 2 - 8°C.

Deterioro del Reactivo:

El reactivo se debe desechar si:

1. Turbidez se ha producido; turbidez puede ser un signo de contaminación.
2. El reactivo no cumple con las reclamaciones de linealidad o no recupera los valores de control en el rango indicado.

Recolección de la Muestra:

1. Las muestras de prueba deben ser suero y libre de hemólisis.

2. El colesterol en suero es estable durante siete (7) días a temperatura ambiente (18-25°C) y seis (6) meses cuando se congela y protegida correctamente contra evaporación.⁴

Sustancias de Interferencia:

Anticoagulantes tales como fluoruro y oxalato resultarán en valores bajos falsos.⁵ La prueba no es influenciada por los valores de hemoglobina hasta 200 mg/dL o por niveles de bilirrubina hasta 10 mg/dL. Interferencia de especímenes altamente ictericas y hemolizadas en gran medida se puede corregir mediante el uso de un blanco de suero.⁵

Materiales Necesarios pero no Suministrados:

1. Espectrofotómetro que permita medir la absorbancia a 520nm.
2. Tubos de ensayo / estante.
3. Pipetas de precisión.
4. Cronómetro.
5. Bloque de calentamiento (37°C).

Instrucciones Generales:

El reactivo para el colesterol se destina para el uso como un procedimiento automatizado en instrumentos de química o como un procedimiento manual en un espectrofotómetro adecuado.

Procedimiento Automatizado:

Por favor, consulte el manual de aplicación apropiado disponible.

Procedimiento Manual:

1. Etiquete los tubos: blanco, estándar, control, paciente, etc.
2. Pipetear 1.0 mL de reactivo en todos los tubos y pre-caliente a 37°C durante al menos dos (2) minutos.
3. Añadir 0.01 mL (10 μ L) de muestra a los tubos respectivos, mezclar y volver a 37°C.
4. Incubar todos los tubos a 37°C durante diez (10) minutos.
5. Cero el espectrofotómetro con el blanco de reactivo a 520nm (intervalo de longitud de onda: 500 – 550 nm).
6. Leer y anotar la absorbancia de todos los tubos.

*Un calibrador multi-uso se puede usar para reemplazar el estándar.

NOTA: Si el espectrofotómetro utilizado requiere un volumen final mayor que 1.0 ml para una lectura precisa, utilizar 0.025 mL (25 μ L) de muestra a 3.0 mL de reactivo. Realizar la prueba como se describe anteriormente.

Calibración:

Los procedimientos se calibran con la solución patrón, que se incluye con cada serie de pruebas. Su absorbancia se utiliza para calcular los resultados. Se recomienda establecer una curva de linealidad hasta 500 mg/dL con otras soluciones comerciales estándar disponibles para verificar el rendimiento de los instrumentos y reactivos.

Limitaciones:

El reactivo es lineal a 500 mg/dL.

1. Las muestras con valores superiores a 500 mg/dL se deben diluir 1:1 con solución salina isotónica y volver a analizar. Multiplicar los resultados finales por dos (2).
2. Sueros muy lipémicos requieren un "blanco de muestra." Añadir 0.02 mL (20 μ L) de la muestra con solución salina 2.5 mL, mezclar y leer la absorbancia contra el agua. Restar este valor de la absorbancia del paciente para obtener la lectura corregida.

Cálculos:

(A = Absorbancia)

$$\frac{A(\text{paciente})}{A(\text{estándar})} \times \text{Conc. de estándar (mg/dL)} = \text{Conc. de paciente (mg/dL)}$$

Ejemplo:

A (paciente) = 0.40, A (estándar) = 0.32, Concentración de estándar = 200 mg/dL.

$$\frac{0.40 \times 200}{0.32} = 250 \text{ mg/dL}$$

Control de Calidad:

Se recomienda que los valores altos y bajos de controles de colesterol se incluyan en cada serie de pruebas. Material de control comercialmente disponible con los valores de colesterol establecidos pueden ser utilizados para el control de calidad. El valor asignado del material de control debe ser

confirmado por la aplicación elegida. Si no se obtiene el rango apropiado de valores en el ensayo de material de control puede indicar deterioro del reactivo, mal funcionamiento del instrumento, o errores de procedimiento. Se recomienda que material de referencia certificado por CDC o NIST esté incluido en la prueba para asegurar el rendimiento del examen.

Valores Esperados:

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio establezca su propio rango normal.

Clasificación de Riesgo	Colesterol Total en Sangre mg/dL
Deseable	<200
Límite Alto	200-239
Alto	\geq 240

Características de Desempeño:

1. Linealidad: 500 mg/L.
2. Sensibilidad: Un cambio de absorbancia de 0.001 a 520 nm corresponde a 1 mg/dL bajo la condición indicada de este sistema de prueba.
3. Comparación: Una comparación entre este procedimiento y uno que está certificado por el Centro para el Control de Enfermedades (CDC) y el Programa de Educación Nacional de Colesterol (NCEP) sobre la base de muestras humanas probadas tanto por el método de Abell-Kendall y por el método que está certificado produjo una ecuación de regresión de $y = 0.94x - 2.80$ (N = 47) con un coeficiente de correlación de 0.99.
4. Precisión:

Entre Corrida:

Promedio (mg/dL)	S.D.	C.V. (%)
150	9.7	6.5
124	8.8	7.0

Corrida a Corrida:

Promedio (mg/dL)	S.D.	C.V. (%)
142	7.4	5.2
114	6.1	5.3

5. Especificidad: El colesterol oxidasa no es totalmente específico para el colesterol. Otros análogos de colesterol (dihidrocolesterol, 7-dehidrocolesterol, 2-O hidroxicolesterol, etc.) también se oxidan. Estos análogos normalmente no ocurren en cantidades apreciables en el suero.

Referencias

1. Beaumont, J.L., Crison, L.A., Cooper, G.R., Feifar, Z., Frederickson, D.S., and Strasser, T.; Classification of Hyperlipidemias and Hyperlipoproteinemias. Standard Methods of Clinical Chemistry vol. 9, Academic Press, New York, NY (1972).
2. Holvey, D.N., ed. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy. Merck and Co., Inc. Rahway, NJ (1972).
3. Allain, C.C., et al., Clin. Chem. 20:470 (1974).
4. Tietz, N.W., Fundamentals of Clin. Chem., Philadelphia, W.B. Saunders (1970).
5. Young, D.S., et al., Clin. Chem. 21 No. 5 (1975).
6. Naito, H.K., et al., Clin. Chem. 34:193 (1988).

