

LIPIDOS Y LIPOPROTEINAS SERICAS

OBJETIVOS

- Determinación de colesterol total y triglicéridos por método enzimático.
- Determinación de colesterol de HDL y de LDL por método homogéneo o precipitación selectiva.
- Interpretación de la información provista por el fabricante de métodos.

ETAPA PREANALITICA

Condiciones a cumplir para el estudio de lípidos:

- ❖ Estado metabólico estable.
- ❖ Mantener dieta habitual y peso estable por lo menos durante 2 semanas.
- ❖ Ayuno de 12 hs.

Si bien el colesterol no se ve afectado por menor tiempo de ayuno, se consensuó este tiempo para estandarizar las condiciones preanalíticas del estudio de lípidos. Actualmente se considera la determinación sin ayuno previo.

No ingerir bebidas alcohólicas en exceso 24 hs. antes.

- ❖ Muestra

La muestra recomendada es suero aunque se puede utilizar plasma anticoagulado con EDTA considerando un factor = 1,03 para calcular la concentración de colesterol. Algunos autores recomiendan Heparina.

- ❖ Interferencias

Bilirrubina en concentraciones > 20 mg/dl (suero icterico) interfiere por su espectro de absorción y porque compite a nivel de la peroxidasa inhibiendo la reacción.

Hemoglobina > 15 g/dl (hemólisis moderada o severa) produce falsos aumentos.

Acido ascórbico > 8 mg/dl también compite con la peroxidasa.

En sueros hiperlipémicos de aspecto turbio se puede diluir el volumen final de reacción a $\frac{1}{2}$ ó $\frac{1}{3}$ con blanco de reactivos, repetir la lectura y multiplicar por la dilución. Si la lipemia origina opalescencia en la coloración final, se puede procesar un blanco de muestra para restar.

- ❖ Conservación de la muestra

Se puede conservar el suero, en estado líquido, en heladera hasta 4 días para la determinación de colesterol y triglicéridos pero no más de 48 hs. para el fraccionamiento lipoproteico.

- ❖ Estasis venoso

Como los lípidos son transportados por complejos lipoproteicos, el estancamiento del flujo sanguíneo puede dar valores falsamente aumentados. Debe minimizarse la estasis venosa durante la venopunción.

- ❖ Cambios de postura

Los cambios de concentración proteica debidos a cambios del agua plasmática se producen en 15 minutos por lo que se debe tomar la muestra al paciente sentado y con reposo previo de 5 minutos.

- ❖ Actividad física

En las horas siguientes al ejercicio intenso puede haber moderada deshidratación extracelular y con ello, hemoconcentración que eleva la proteinemia. El efecto aumenta a mayor temperatura ambiente y nivel de ejercicio. No realizar actividad física intensa 24 hs. antes.

- ❖ Variabilidad biológica

Debido a la elevada variabilidad encontrada para colesterol y más aún para triglicéridos, se recomienda realizar al menos 2 determinaciones con no más de 2 semanas de diferencia.

BIOSEGURIDAD

Tratar las muestras como potencialmente infecciosas.

ETAPA ANALITICA

1) Metodología: **cuantificación de colesterol total por método enzimático manual.**

FUNDAMENTO

Los métodos para colesterol evolucionaron desde los químicos directos en una sola etapa y los extractivos en 2, 3, y 4 etapas hasta los actuales enzimáticos, que son de elección por ser más sensibles y específicos. Aún así, el método de referencia sigue siendo el de Abell-Levy-Brodie-Kendall.

El colesterol es oxidado enzimáticamente por la colesterol-oxidasa previa hidrólisis enzimática de los ésteres mediante una lipasa de origen fangal. El agua oxigenada generada en la oxidación, produce la copulación oxidativa del fenol con la 4-aminofenazona en una reacción (Trinder) catalizada por la peroxidasa. El producto es una quinonimina roja con un máximo de absorbancia a 505 nm.

Controlar este fundamento con el descripto en el inserto del método a usar.

TECNICA OPERATORIA

Muestra:

- ❖ Suero libre de hemólisis

Material requerido:

- ❖ Espectrofotómetro o Fotocolorímetro.
- ❖ Micropipetas y pipetas capaces de medir los volúmenes indicados.
- ❖ Tubos de Kahn.
- ❖ Tubos de fotocolorímetro o cubetas espectrofotométricas.
- ❖ Baño de agua a 37 °C.
- ❖ Reloj o Timer.

Reactivos: Entre los distintos reactivos comerciales pueden diferir las concentraciones de las enzimas. En el TP se usará Colestat Enzimático de Wiener.

- ❖ Estándar o Testigo: Colesterol en solución (200 mg/dl)

Mezclar por inversión antes de usar.

- ❖ Enzimas: Lipasa fungal (300 U/ml)
Colesterol oxidasa (3 U/ml)
Peroxidasa (20 U/ml)

Homogeneizar por inversión antes de usar, evitando la formación de espuma.

- ❖ Reactivo 4 - AF (25 mmol/l)
- ❖ Reactivo Fenol (55 mmol/l)

Reactivo de Trabajo: respetando el orden de agregado y de acuerdo al volumen de trabajo colocar en una probeta 50 partes de agua destilada, 5 partes de Reactivo 4-AF, 5 partes de Reactivo Fenol y llevar a 100 partes con agua destilada. Agregar 2 partes de enzimas previamente homogeneizadas. Mezclar por inversión, sin agitar. Rotular y fechar. Es estable 1 mes en frasco de vidrio color caramelo y en refrigerador. Se pueden preparar distintas cantidades respetando las proporciones establecidas. Desechar cuando las lecturas del Blanco superen 0,160 D.O. o cuando las del Testigo sean anormalmente bajas.

PROCEDIMIENTO

Diseñar un esquema del procedimiento de acuerdo al inserto del método a usar.

Cálculos:

Unidades SI:

colesterol mmol/l = colesterol mg/dl x 0,0259

colesterol mg/dl = colesterol mmol/l x 39

Control de Calidad Interno: Pueden utilizarse sueros comerciales Standatrol 2 niveles (Wiener), Precinorm-Precipath (Roche) y/o pool de sueros preparado en el laboratorio obteniendo los estadísticos propios.

Control de Calidad Externo: Participar de Programas Interlaboratorios reconocidos.

PERFORMANCE DEL METODO (WIENER):

- Linealidad: La reacción cumple con la ley de Lambert-Beer, es lineal hasta 500 mg/dl. Determinar el límite con el instrumental de lectura a usar.
- Límite de detección: En espectrofotómetro y en las condiciones del método, para un cambio de 0,001 unidades de absorbancia se requiere un cambio mínimo de 0,7 mg/dl.
- Reproducibilidad: A diferentes niveles de concentración se obtuvo un Coeficiente de Variación de 2,32% a 2,13%.
- Exactitud: Respecto de un verdadero valor hipotético se estima una inexactitud de $\pm 2,9\%$
- Automatizable: Para analizadores automáticos el método desarrollado presenta algunas diferencias.

2) Metodología: **cuantificación de colesterol de HDL por método enzimático manual con precipitación selectiva previa.**

FUNDAMENTO

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) realizan el transporte de colesterol desde los tejidos periféricos hacia el hígado para ser metabolizado, con lo cual se evita o disminuye la proliferación y crecimiento de lesiones ateromatosas. Debido a esto se consideran un factor protector o de riesgo negativo, avalado por su correlación inversa con eventos cardiovasculares.

La cuantificación de las mismas se realiza indirectamente a través de su separación de otras lipoproteínas y de la determinación del colesterol que contienen. El método de referencia para separar lipoproteínas es la Ultracentrifugación en función de sus densidades. En el laboratorio clínico, como método de elección se recurre a la separación mediante una precipitación selectiva con un polianión y un catión divalente.

En el TP utilizaremos como reactivo precipitante el Sulfato de Dextran el cual se une a la apoproteína B formando un complejo que precipita en presencia de Mg^{++} . En el sobrenadante, separado por centrifugación y con las HDL que contienen apoproteína A, se determina el colesterol empleando el sistema enzimático colesteroloxidasa/peroxidasa con colorimetría según Trinder (Wiener).

TECNICA OPERATORIA

Muestra:

- ❖ Suero libre de hemólisis. Mantener refrigerado y procesar dentro de las 24 hs.

Material requerido:

- ❖ Espectrofotómetro o Fotocolorímetro.
- ❖ Micropipetas y pipetas capaces de medir los volúmenes indicados.
- ❖ Tubos de Kahn.
- ❖ Tubos de fotocolorímetro o cubetas espectrofotométricas.
- ❖ Baño de agua a 37 °C.
- ❖ Reloj o Timer.

Reactivos:

- ❖ Reactivo Dextrán: solución de Sulfato de Dextrán (PM 50.000) 0,032 mmol/l
- ❖ Reactivo Magnesio: solución de $Cl_2Mg \cdot H_2O$ 1,5 mol/l

Reactivo Precipitante: respetando la proporción 1 + 1 pueden prepararse las cantidades necesarias. Mezclar por inversión, rotular y fechar. Es estable 1 año en frasco de vidrio color caramelo y en refrigerador. La contaminación bacteriana deteriora los reactivos.

PROCEDIMIENTO

En un tubo de Kahn medir 0,5 ml (500 ul) de muestra y agregar 50 ul de Reactivo Precipitante. Homogeneizar agitando sin invertir durante 20 segundos y dejar 30-40 minutos en refrigerador. Centrifugar 15 minutos a 3.000 rpm. Para utilizar este sobrenadante es condición que sea límpido. En tubos rotulados colocar:

	Blanco	Testigo	Muestra
Testigo		20 ul	
Sobrenadante			100 ul
Reactivo de trabajo para colesterol enzimático	2 ml	2 ml	2 ml

Mezclar. Incubar en baño de agua a 37 °C durante 15 minutos. Leer en espectrofotómetro a 505 nm o fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm). Color estable 2 horas.

Cálculos:

$$\text{factor} = 45,7 / \text{Absorbancia del Testigo}$$

$$45,7 = 200 \text{ mg/dl} \times \frac{VF_E}{V_M} \times \frac{VR_E}{VR_S} \times \frac{V_S}{V_E}$$

VF_E = volumen final de extracto = 0,55 ml

V_M = volumen de muestra procesada = 0,5 ml

VR_E = volumen de rección con extracto = 2,1 ml

VR_S = volumen de reacción con Standard = 2,02 ml

V_S = volumen de Standard en la reacción = 0,02 ml

V_E = volumen de extracto en la reacción = 0,1 ml

Si se emplean volúmenes diferentes el factor varía y debe ser recalculado.

$$\text{HDL-Colesterol (mg/dl)} = \text{Absorbancia de la Muestra} \times \text{factor}$$

Control de Calidad Interno: Pueden utilizarse sueros comerciales Standatrol 2 niveles (Wiener), Precinorm-Precipath (Roche) y/o pool de sueros preparado en el laboratorio obteniendo los estadísticos propios.

Control de Calidad Externo: Participar de Programas Interlaboratorios reconocidos.

PERFORMANCE DEL METODO (WIENER):

- Linealidad: La reacción cumple con la ley de Lambert-Beer, es lineal hasta 500 mg/dl. Determinar el límite con el instrumental de lectura a usar.
- Reproducibilidad: A un nivel de 29 mg/dl de concentración de HDL-C se obtuvo un Coeficiente de Variación de 3,8% y a 63 mg/dl un CV 3,7%.

3) Metodología: cuantificación de colesterol de LDL por método enzimático manual con precipitación selectiva previa.

FUNDAMENTO

Las LDL o lipoproteínas de baja densidad distribuyen colesterol a los tejidos periféricos mientras circulan por el plasma, siendo las principales responsables de la formación de placas ateromatosas por lo que constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

En el laboratorio clínico se cuantifican precipitándolas selectivamente con polímeros de alto peso molecular.

En el TP utilizaremos como reactivo precipitante el Polivinilsulfato que logra precipitar las LDL, y si hubiere IDL, quedando en el sobrenadante HDL y VLDL. Se determina el colesterol ligado a éstas empleando el sistema enzimático colesterol oxidasa/peroxidasa con colorimetría según Trinder (Wiener) y por diferencia con el colesterol total se obtiene LDL-Colesterol.

TECNICA OPERATORIA

Muestra:

- ❖ Suero libre de hemólisis. Mantener refrigerado y procesar dentro de las 24 hs.

Material requerido:

- ❖ Centrifugadora.
- ❖ Espectrofotómetro o Fotocolorímetro.
- ❖ Micropipetas y pipetas capaces de medir los volúmenes indicados.
- ❖ Tubos de Kahn y/o de centrífuga.
- ❖ Tubos de fotocolorímetro o cubetas espectrofotométricas.
- ❖ Baño de agua a 37 °C.
- ❖ Reloj o Timer.

Reactivos:

- ❖ Reactivo Precipitante: solución 10 g/l de Sulfato de Polivinilo disuelto en Polietilenglicol al 25% listo para usar. Estable en refrigerador hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

PROCEDIMIENTO

En un tubo de Kahn colocar 200 ul de muestra y 100 ul de Reactivo Precipitante. Homogeneizar agitando sin invertir durante 20 segundos y dejar 15 minutos en un baño de agua a 20-25°C. Centrifugar 15 minutos a 3.000 rpm. Separar inmediatamente el sobrenadante y determinar el colesterol.

En tubos rotulados colocar:

	Blanco	Testigo	Muestra
Testigo		20 ul	
Sobrenadante			100 ul
Reactivo de trabajo	2 ml	2 ml	2 ml
para colesterol enzimático			

Mezclar. Incubar en baño de agua a 37 °C durante 15 minutos. Leer en espectrofotómetro a 505 nm o fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm). Color estable 2 horas.

Cálculos:

$$\text{factor} = 62,4 / \text{Absorbancia del Testigo}$$

$$62,4 = 200 \text{ mg/dl} \times \frac{V_{FE}}{V_M} \times \frac{V_{RE}}{V_{RS}} \times \frac{V_S}{V_E}$$

V_{FE} = volumen final de extracto = 0,3 ml

V_M = volumen de muestra procesada = 0,2 ml

V_{RE} = volumen de rección con extracto = 2,1 ml

V_{RS} = volumen de reacción con Standard = 2,02 ml

V_S = volumen de Standard en la reacción = 0,02 ml

V_E = volumen de extracto en la reacción = 0,1 ml

Si se emplean volúmenes diferentes el factor varía y debe ser recalculado.

$$\text{LDL-Colesterol (mg/dl)} = \text{Colesterol total} - \text{Absorbancia de la Muestra} \times \text{factor}$$

Control de Calidad Interno: Pueden utilizarse sueros comerciales Standatrol 2 niveles (Wiener), Precinorm-Precipath (Roche) y/o pool de sueros preparado en el laboratorio obteniendo los estadísticos propios.

Control de Calidad Externo: Participar de Programas Interlaboratorios reconocidos.

PERFORMANCE DEL METODO (WIENER):

- Reproducibilidad: Para niveles de 114 y 203 mg/dl de concentración de LDL-C se obtuvieron CV de 2,6% y 2,0% respectivamente.

4) Metodología: **cuantificación de triglicéridos por método enzimático manual.**

FUNDAMENTO

También para triglicéridos los métodos evolucionaron desde los químicos hasta los enzimáticos de elección por ser más sensibles y específicos. El método de referencia sigue siendo químico con ácido cromotrópico.

Los triglicéridos son hidrolizados a glicerol y ácidos grasos mediante la lipoproteinlipasa. El glicerol así producido se determina en forma totalmente enzimática por medio de una secuencia reaccional que incluye su fosforilación a glicerol-1-fosfato en presencia de glicerokinasa y la oxidación del derivado fosforilado mediante glicerol fosfato oxidasa, con producción de agua oxigenada. A su vez, esta última produce la copulación oxidativa del clorofenol y la 4-aminofenazona, catalizada por la peroxidasa con formación de una quinonimina roja que absorbe a 505 nm.

TECNICA OPERATORIA

Muestra:

- ❖ Suero libre de hemólisis

Material requerido:

- ❖ Espectrofotómetro o Fotocolorímetro.
- ❖ Micropipetas y pipetas capaces de medir los volúmenes indicados.
- ❖ Tubos de Kahn.
- ❖ Tubos de fotocolorímetro o cubetas espectrofotométricas.
- ❖ Baño de agua a 37 °C.
- ❖ Reloj o Timer.

Reactivos: Entre los distintos reactivos comerciales pueden diferir las concentraciones de las enzimas.

En el TP se usará TG Color GPO/PAP de Wiener.

- ❖ Estándar o Testigo: solución de glicerol 2,26 mmol/l (equivalente a 2 g/l de trioleína)
- ❖ Enzimas: Lipoproteinlipasa
Glicerokinasa
Glicerol fosfato oxidasa
Peroxidasa
Reactivo 4 - AF
Reactivo ATP

- ❖ Buffer: solución de buffer Goods conteniendo clorofenol, pH 7,5

Reactivo de Trabajo: Según las instrucciones del fabricante reconstituir el vial liofilizado con buffer, mezclar hasta disolución completa. Homogeneizar y fechar. Estable 1 mes en refrigerador. Desechar cuando las lecturas del Blanco superen 0,160 D.O. o las del Testigo sean anormalmente bajas.

PROCEDIMIENTO

Homogeneizar la muestra antes de usar, especialmente frente a sueros lechosos.

Diseñar un esquema del procedimiento de acuerdo al inserto del método a usar.

Cálculos:

Control de Calidad Interno: Pueden utilizarse sueros comerciales Standatrol 2 niveles (Wiener), Precinorm-Precipath (Roche) y/o pool de sueros preparado en el laboratorio obteniendo los estadísticos propios.

Control de Calidad Externo: Participar de Programas Interlaboratorios reconocidos.

PERFORMANCE DEL METODO (WIENER):

- Linealidad: La reacción es lineal hasta 1.000 mg/dl. Para valores superiores, repetir la determinación con muestra diluida al medio con solución fisiológica y multiplicar el resultado por la dilución efectuada.
- Límite de detección: En espectrofotómetro y en las condiciones del método, para un cambio de 0,001 unidades de absorbancia se requiere un cambio mínimo de 0,8 mg/dl.
- Reproducibilidad: para 2 niveles de concentración 114 mg/dl y 741 mg/dl se obtuvieron Coeficientes de Variación de 1,82% y 2,11%.
- Automatizable: Para analizadores automáticos el método desarrollado presenta algunas diferencias.

BIBLIOGRAFIA

Gradwohl- Sonnerwirth- Jaret "Métodos y Diagnósticos del Laboratorio Clínico" 8ª

Edición 1983. Capítulo 9. Editorial Panamericana.

Pesce - Kaplan "Química Clínica. Métodos". Edición 1990. Editorial Panamericana.

Todd - Sanford "Diagnóstico clínico por el laboratorio" I. Davidson y J. B. Henry.

Editorial Salvat.

Alfonso Balcells "La Clínica y el Laboratorio". 17ª Edición, 1997. Editorial Masson S.A. Barcelona (España).

Oberman, A. y otros "Fundamentos y Manejo de los Trastornos Lipídicos" 1993. Editorial Médica Hispanoamericana.

Vademécum Laboratorios WIENER.

Agregar bibliografía utilizada.