

Influencia de la temperatura de incubación en la determinación de Colesterol unido a Lipoproteínas de Alta Densidad por separación con ácido fosfotúngstico-MgCl₂

Cámara María Silvia¹; Gatti Paula²; Gomez Ayet Mario³

¹ - Laboratorio de Control de Calidad – Sociedad de Bioquímicos de Santa Fe, Avda. Urquiza 2657, Santa Fe (CP 3000), Argentina FAX 0342-455-2708; e-mail: sbstafe@alpha.arcrde.edu.ar

² - Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL) - Paraje El Pozo CC 530 Santa Fe (CP 3000) República Argentina

³ - Departamento de Bioquímica Clínica – F. de Bqca. y Cs. Biológicas (UNL) - Paraje El Pozo CC 530 Santa Fe (CP 3000) República Argentina e-mail maga@fcb.unl.edu.ar

RESUMEN: La incorporación del dosaje de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad a las prácticas de rutina del laboratorio de análisis clínicos, para evaluar el riesgo de enfermedad cardiovascular; está condicionada a la disponibilidad de métodos precisos, exactos, simples, rápidos y económicos.

En nuestro medio el método más empleado se fundamenta en la separación de las fracciones lipoproteicas por precipitación con ácido fosfotúngstico/MgCl₂, y dosaje de colesterol en el sobrenadante.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la temperatura sobre la etapa de separación, paso crítico del método, empleando una técnica modificada.

Se procesaron replicados de 20 pools de suero a diferentes temperaturas.

El análisis estadístico de los resultados indica que no existen diferencias significativas en los resultados obtenidos entre 15° C y 30° C.

Se concluye que la técnica modificada permite aprovechar nuevas propiedades operativas y conserva la ventaja de trabajar a temperatura ambiente.

SUMMARY: EFFECT OF INCUBATION TEMPERATURE ON HIGH DENSITY LIPOPROTEIN CHOLESTEROL DETERMINATION BY SEPARATION WITH FOSFOTUNGSTIC ACID/MGCL₂. Cámara María Silvia¹; Gatti Paula²; Gomez Ayet Mario³ The incorporation of high density lipoprotein cholesterol measurement to the routine laboratories, in order to evaluate the risk of coronary heart disease is conditioned to the readiness of precise, accurate, simple, rapid and economic methods.

In our country most laboratories use the method based on lipoprotein fractions separation by precipitation with fosfotungstic acid/MgCl₂, and cholesterol measurement in the supernatant.

The aim of the present work was to evaluate the effect of the temperature on the separation stage, critical step of the method, using a modified technique.

Serum pools (20) from fasted people were assayed for HDL-cholesterol at different temperatures.

The statistical analysis of the results indicates that significant differences don't exist in the results obtained between 15° C and 30° C.

We conclude that the modified technique allows to take advantage of new operative properties and it conserves the advantage of working at ambient temperature.

Introducción

El Segundo Informe del Panel de Tratamiento del Adulto (junio 1993) del National Cholesterol Education Program (NCEP), ha reafirmado la importancia del colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad como factor mayor de riesgo de Enfermedad Cardio-Vascular (ECV), recomendando que se incluya su determinación en las prácticas de laboratorio si se dispone de un método que asegure exactitud y precisión (1).

La inclusión del dosaje de colesterol-HDL dentro de las prácticas de rutina destinadas a evaluar el riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV) significa un importante desafío analítico, por las dificultades metodológicas que se plantean siempre que se trata de cuantificar especies químicas de composición indefinida y heterogénea y por que los requerimientos metodológicos son muy exigentes.

Estas exigencias están justificadas:

1) por el estrecho rango que separa los valores "de riesgo" y los valores "protectores".

2) por que el punto de corte para considerar los valores de riesgo está situado en el extremo inferior del intervalo de concentraciones de colesterol-HDL, rango en el que pequeños errores son relativamente importantes.

3) por que el valor obtenido analíticamente para colesterol-HDL se emplea frecuentemente para estimar, por cálculo, la concentración de colesterol-LDL; por lo tanto los errores en la estimación del primer valor se propagan con igual magnitud y signo contrario (2).

Se han establecido objetivos analíticos a lograr en 1998. La exactitud debe ser $\pm 5\%$ respecto del Método de Referencia del Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Para la precisión de los replicados, se ha establecido un límite de tolerancia del CV de hasta el 4% (2).

La precipitación diferencial de las lipoproteínas con soluciones polianiónicas, es una técnica común y adecuada para el laboratorio clínico, debido a su simplicidad, la eliminación de instrumentos costosos, rapidez y bajo costo.

Los dos métodos mas usados se basan en el uso de dextrán sulfato/MgCl₂ y ácido fosfotúngstico/MgCl₂ (AFT-Mg). Numerosos trabajos han comparado estos métodos entre sí y con respecto al método de referencia (3,4).

El método original de AFT-Mg tiene la ventaja de separar más eficientemente las fracciones lipoproteicas en presencia de concentraciones elevadas de triglicéridos; pero tiene como inconvenientes una relación muestra/reactivo precipitante muy desfavorable (10:1) y la inestabilidad de la solución precipitante, razón por la cual es necesario mantener separadas, hasta el momento de su utilización, las soluciones de ácido fosfotúngstico y de cloruro de magnesio.

Por su parte el método de dextrán-Mg tiene el inconveniente de requerir una incubación a baja temperatura del precipitado, antes de la centrifugación para separar el sobrenadante que contiene las partículas HDL.

Draeger, Wahlefeld y Ziegerhorn (5) han propuesto un cambio de las concentraciones de ácido fosfotúngstico y de iones magnesio del reactivo AFT-Mg; logrando así una solución de menor pH, que es más estable y más eficiente para separar las partículas lipoproteicas. Esta modificación ha permitido el desarrollo de un reactivo consistente en una solución única y estable, mediante la cual se pueden

precipitar las partículas que contienen apoproteína B con una mejor relación muestra/reactivo (1:2).

Diversos trabajos han verificado la exactitud y precisión de la técnica modificada, demostrando que es apta para el uso cotidiano (6,7).

Una de las características de la técnica original es que la incubación a que se debe someter la mezcla muestra + reactivo precipitante antes de centrifugar para separar las fases, se puede realizar a temperatura ambiente, lo cual constituye una marcada ventaja sobre el método de dextrán-Mg.

Con el objeto de verificar si la temperatura de incubación del precipitado influye en el valor final de Colesterol-HDL cuando se emplea la técnica modificada, hemos diseñado el presente experimento.

Materiales y Métodos

Reactivos

Para la realización de la precipitación selectiva de las lipoproteínas que contienen apoproteína B, se utilizó un "reactivo precipitante único" con la siguiente composición:

Acido fosfotúngstico (E. Merck):

0,55 mmol/l

Magnesio Cloruro (Sigma Chemical Co):

25 mmol/l

La determinación del colesterol ligado a las HDL en el sobrenadante se realizó mediante el método enzimático colesterol esterasa/colesterol oxidasa/peroxidasa/Rvo.Trinder (8), empleando un reactivo comercial ("SB" Sociedad de Bioquímicos de Santa Fe)

Instrumental

- Espectrofotómetro: las lecturas finales de los ensayos se realizaron en un espectrofotómetro de doble haz UV-VIS SHIMADZU 1601
- Balanza analítica: Bosch s-2000
- Centrífuga
- Baño termostático
- Micropipetas de constricción de 20 y 100 microlitros.

Muestras

Se obtuvieron muestras de sangre por punción

venosa efectuada a individuos con un ayuno previo de 10 a 12 horas; las extracciones de sangre se realizaron a primera hora de la mañana. Las muestras se dejaron coagular a temperatura ambiente y se separó el suero por centrifugación dentro de las dos horas de obtenidas (2).

Cuando las determinaciones no se pudieron realizar en el día de la extracción de las muestras, los sueros se conservaron a 4° C por un máximo de 48 horas.

Se trabajó sobre pooles de suero, preparados mezclando y homogeneizando las muestras individuales media hora antes de efectuar los dosajes.

Técnica operatoria

La precipitación de las lipoproteínas que contienen apoproteína B se realizó en tubos de hemólisis (12x100 mm), colocando 0,5 ml del pool de sueros a analizar y se le agregó 1 ml del "Reactivo Precipitante Único". Se agitó manualmente para homogeneizar sin invertir y se dejó en reposo 10 minutos a una determinada temperatura. Luego se centrifugó a 4000 r.p.m. durante 10 a 15 minutos.

Para la determinación del colesterol ligado a las HDL, se trabajó con 100 microlitros del sobrenadante de la precipitación y 2 ml del "Reactivo Final de Trabajo".

El blanco de reactivos se preparó con 2 ml del reactivo de trabajo; el standard con 20 microlitros de solución patrón de colesterol (2 g/l) y 2 ml de reactivo final de trabajo.

La determinación requiere de una incubación en baño de agua a 37° C durante 15 minutos; luego se efectuó la lectura a 505 nm contra blanco de reactivos.

Los volúmenes de los sobrenadantes de las precipitaciones, standard y pool de sueros se midieron con micropipetas de constricción y el reactivo final de trabajo se midió con volpipeta.

Para calcular los valores de colesterol-HDL en gramos/litro se utilizó un factor de cálculo obtenido a partir de la lectura de la solución standard de colesterol y teniendo en cuenta que la solución patrón y las muestras fueron sometidas a diferentes condiciones de trabajo.

Diseño experimental

Se analizaron 20 pooles de sueros; para cada uno de ellos se practicaron nueve (9) precipitaciones

con "Reactivo Precipitante Único", los tubos se dejaron en reposo durante 10 minutos; 3 de ellos a 15° C, 3 a 20° C y los 3 restantes a 30° C

La posterior determinación del colesterol de las HDL se efectuó por triplicado a partir de cada tubo de precipitación y se obtuvieron así 9 valores de colesterol-HDL para cada pool y para cada temperatura de trabajo.

Análisis estadístico

Para establecer si las medias y/o medianas del muestreo a las distintas temperaturas de trabajo (15, 20 y 30° C) eran significativamente diferentes se realizó un estudio preliminar consistente en la graficación de los datos mediante el método de "box plot" y posteriormente se aplicó el Análisis de Varianza.

Para el procesamiento de los datos se empleó el software SPSS versión 6.1.3/95.

Resultados y Discusión

Por diferentes circunstancias se perdieron datos, razón por la cual al análisis estadístico final ingresaron 147 valores pareados para cada temperatura, que se resumen en las siguientes tablas:

Tabla 1. Valores promedio de cada pool para cada temperatura ensayada, ordenados en orden creciente respecto a la concentración colesterol-HDL (gramos/litro)

Pool	media a 15° C	media a 20° C	media a 30° C
1	0,28	0,28	0,28
2	0,36	0,36	0,36
3	0,43	0,43	0,43
4	0,43	0,43	0,47
5	0,44	0,45	0,43
6	0,45	0,40	0,41
7	0,45	0,44	0,41
8	0,46	0,46	0,46
9	0,47	0,45	0,45
10	0,47	0,45	0,46
11	0,48	0,49	0,49
12	0,49	0,50	0,48
13	0,52	0,51	0,51
14	0,55	0,56	0,56
15	0,56	0,54	0,54
16	0,58	0,55	0,59
17	0,59	0,56	0,53
18	0,61	0,62	0,61
19	0,63	0,63	0,66
20	0,70	0,73	0,73

Tabla 2. Promedio y rango de valores de colesterol-HDL (g/l) observados para cada temperatura ensayada

Grupos	n (nro. de muestras)	Promedio General	Valor Menor	Valor Mayor
15° C	147	0.495	0,28	0,70
20° C	147	0.489	0,28	0,73
30° C	147	0.488	0,28	0,73

Figura 1. Gráfico "Box plot" donde se agrupan los datos para cada temperatura. La "caja" representa el 50 % de los valores centrales y la línea gruesa la mediana. Los círculos representan los valores de colesterol-HDL hallados fuera de los percentilos 5º y 95º

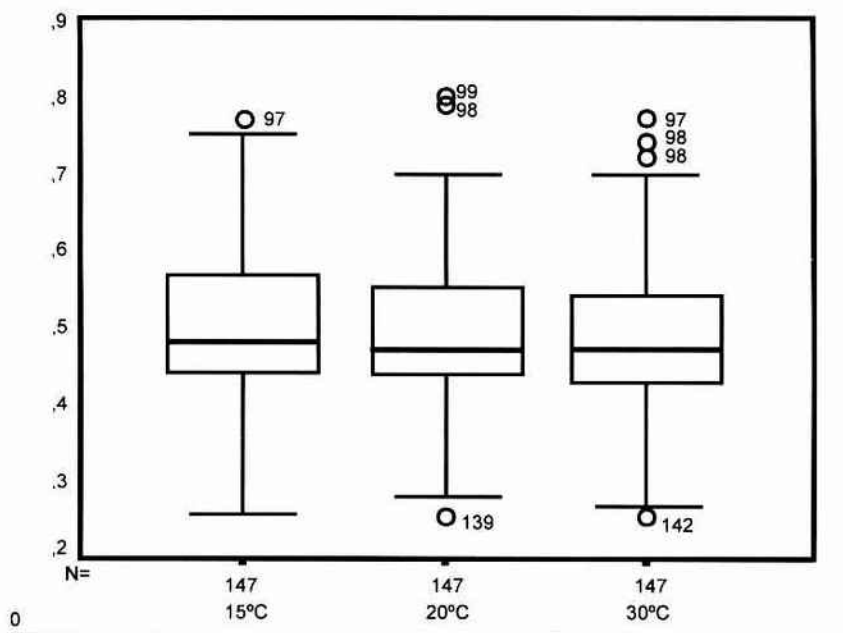


Tabla 3. Los datos que se obtuvieron con el ANOVA se resumen en la siguiente tabla

Origen de la variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.00444127	2	0.002220635	0.22713	0.79691	3.01631
Dentro de los grupos	4.28227891	438	0.00977689			
Total	4.28672018	440				

Tanto la expresión gráfica de los resultados como los parámetros estadísticos resultan concluyentes al mostrar claramente que los datos obtenidos entre los 15 y los 30° C son estadísticamente indistinguibles.

De esta forma se verifica que el reactivo modificado conserva la capacidad de separar eficientemente las fracciones lipoproteicas independientemente de la temperatura de incubación, dentro de un rango térmico que hace innecesario el uso de un baño termostatzado, permitiendo la incubación a "temperatura ambiente".

Conclusión

Considerando los resultados obtenidos, el método de ácido fosfotúngstico-MgCl₂ modificado de acuerdo a Draeger, Wahlefeld y Ziegenhorn constituye una excelente alternativa metodológica para el dosaje de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad por cuanto conserva las propiedades positivas del método original respecto de la independencia de la temperatura de incubación del precipitado y eficiente separación de las fracciones lipoproteicas a la vez que introduce significativas ventajas

operativas, pues mejora la estabilidad del reactivo precipitante y la relación muestra/reactivo, lo que permite disminuir el volumen de muestra necesario para la determinación.

29, 12:2026-2030.

8- Allain C.C., Poon L.S., Chan C.S.G., Richmond W. and Fu P.C. (1974) Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol. *Clin. Chem.* **20**, 4: 470-475.

Agradecimientos

Agradecemos a la Lic. Stella Maris Vaira y a la Prof. Elena Carreras (Departamento de Matemáticas de la Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas – UNL) por el pertinente asesoramiento en el estudio estadístico.

El presente trabajo se realizó en el marco de una Pasantía en Investigación aprobada por la Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas – UNL (Res.164/97) y financiado por la Sociedad de Bioquímicos de Santa Fe.

Bibliografía

- 1- Expert Panel on Detection, Evolution and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults.(1993) Summary of the second report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel (Adults Treatment Panel II). *J.A.M.A.* **269**: 3015-1023.
- 2- Russel Warnick G. and Wood P.D. (1995) National Cholesterol Education Program Recommendations for Measurement of High-Density Lipoprotein Cholesterol. Executive Summary. *Clin. Chem.* **41**, 10: 1427-1433.
- 3- Harris N., Galpchian V. and Rifai N. (1996) Three routine methods for measuring high-density lipoprotein cholesterol compared with the Reference Method. *Clin. Chem.* **42**, 5: 738-743.
- 4- Demacker P.N.M., Hessels M., Toenhake-Dijksha H. and Baadenhuijsen H. (1997) Precipitation methods for high-density lipoprotein cholesterol measurement compared, and final evaluation under routine operating conditions of a method with a low sample-to-reagent ratio. *Clin. Chem.* **43**, 4: 663-668.
- 5- Draeger B., Wahlefeld A.W., and Ziegenhorn J. (1982) A practical method for HDL-cholesterol quantitation. *Lab. Med.* **6**: 198-202.
- 6- Draeger B., Ziegenhorn J. and Wahlefeld A.W.(1982) Improved method for the precipitation of serum high-density lipoprotein cholesterol (HDL-cholesterol). *Clin. Chem.* **28**: 1574-1578.
- 7- Assmann G., Schriewer H., Schmitz G. and Hägele E.O. (1983) Cuantificación de high-density Lipoprotein Cholesterol by precipitation with Phosphotungstic Acid/MgCl₂. *Clin. Chem.*