

REACTIVO DE COLESTEROL

USO:

Para la determinación cuantitativa de Colesterol Total en suero.

HISTORIA DEL METODO:

Un método desarrollado en los 1800 por Liberman y Buchard aun se usa a pesar de su naturaleza corrosiva y su susceptibilidad a muchas sustancias de interferencia.

El trabajo con un procedimiento enzimático inicio con Flegg y Richmond en los 70 s. Allain y Roschland iniciaron utilizando colesterol esterasa y oxidasa en un solo reactivo para determinar colesterol total en suero. El sistema de color de Trinder peroxidasa-Fenol -4 Aminoantipirina ha sido utilizado hoy. La única desventaja fue la propiedad corrosiva del fenol. El presente método utiliza un sustituto de fenol que no es corrosivo.

PRINCIPIO:

Esteres de Colesterol — C. Esterasa \rightarrow Colesterol \rightarrow Ac. Grasos Colesterol \rightarrow O2 — C. Oxidasa \rightarrow Colesterol \rightarrow O3 — \rightarrow Colesterol \rightarrow O4 — \rightarrow Colesterol \rightarrow O4 — \rightarrow Peroxidasa \rightarrow Quinoneimina \rightarrow 2H2O2 (color rojo)

La intensidad del color rojo es directamente proporcional al colesterol total en la muestra leída a 520 nm.

REACTIVOS:

Reactivo de colesterol, la concentración se refiere al reactivo reconstituído.

4.- Aminoantipirina 0.6 mM, Colato de sodio 8.0 mM, Colesterol esterasa ≥ 150 u/L, Colesterol oxidasa ≥ 200 u/L, Peroxidasa 1500 u/L. p-Hidroxibencensulfonato 20mM, Surfactante, Buffer pH 7.2, estabilizadores no reactivos y azida de sodio (.01%) como preservativos.

PRECAUCIONES:

- 1. Para diagnostico "in Vitro" solamente.
- 2. El reactivo contiene Azida de sodio, veneno, no se ingiera. puede reaccionar con cobre o puede reaccionar con metales para formar explosivos, lave con gran cantidad de agua.

PREPARACION DEL REACTIVO:

Reconstituya el reactivo con el volumen de agua destilada indicado en la etiqueta. Agite para disolver.

ALMACEN DEL REACTIVO

Almacénelo 2-8 °C, el reactivo reconstituido es estable por 60 días si se almacena en una botella ámbar a 2-8°C.

DETERIORO DEL REACTIVO: No se use si:

- 1. Se le ha humedecido el vial y formado una pasta.
- 2. El reactivo de trabajo no cumple con los parámetros de trabajo.

COLECCION Y ALMACENAMIENTO DE LA MUESTRA:

Se recomienda suero no hemolizado. El colesterol en suero es estable por 7 días a temperatura ambiente (18-25 °C.) y 6 meses cuando se congela y se protege de la evaporación.

INTERFERENCIAS:

Vea Young . Un numero de drogas y sustancias afectan la concentración de colesterol.

MATERIALES PROPORCIONADOS:

Reactivo de colesterol

MATERIALES REQUERIDOS NO PROPORCIONADOS:

- Espetrofotómetro capaz de medir absorbancia a 520 nm
- 2. Tubos de ensayo y gradilla.
- 3. Instrumentos precisos de pipeteo
- 4. Reloj.
- 5. Block térmico.

PROCEDIMIENTO AUTOMATIZADO:

Vea las instrucciones precisas del instrumento.

PROCEDIMIENTO MANUAL:

- Prepare de acuerdo a instrucciones el reactivo.
- Etiquete los tubos blanco, estándar, control, paciente.
- 3. Pipetee 1.0 ml. de reactivo en todos los tubos e incube a 37°C. por 5 minutos.
- 4. Agregue 0.01 ml. (10ul) de muestra a los tubos respectivos, mezcle y regrese a 37 ° C
- 5. Incube los tubos a 37 °C. por 5 minutos.
- 6. Ponga a cero el espectrofotómetro con blanco de reactivo a 520 nm.
- 7. Lea y anote la absorbancia de todos los tubos.

NOTAS DEL PROCEDIMIENTO:

- 1.- Si el espectrofotómetro requiere un volumen final mayor de 1.01 ml. para lectura precisa, use 0.25 ml. (25ul) de muestra con 3.0 ml. de reactivo, realice el examen con las instrucciones de arriba.
- 2.- Los sueros severamente lipémicos requieren un blanco de muestra. Agregue 0.01 ml. (10 ul) de muestra a 1.0 ml. de solución salina, mezcle y lea contra agua, reste este valor de la absorción del paciente para obtener la lectura correcta.

CONTROL DE CALIDAD Y CALIBRACION:

Se pueden utilizar en estándar acuosos para calibrar el procedimiento, o un calibrador de suero apropiado. Se deben correr rutinariamente sueros control para monitorear la reacción.

CALCULOS:

A = Absorbancia

 $\frac{A(paciente)}{A(Estándar)} \times Conc.delEstandar(mg / dl) = Colesterol(mg / dl)$

Ejemplo:

A paciente = 0.40A estándar = 0.32Conc. del estándar = 200 mg dl 0.40 x 200 = 250 mg/dl.

LIMITANTES:

Las muestras con valores que exceden los 500 mg. dl se deben diluir 1:1 con solución salina y multiplicar el resultado por 2.

VALORES ESPERADOS:

Colesterol deseable < 200 (mg/dl) Limite de colesterol alto 200-239 (mg/dl) Colesterol alto > 240 (mg/dl)

DESEMPEÑO:

- 1.- Linearidad: 500 (mg dl)
- 2.- Comparación: entre este procedimiento y otro utilizando fenol produjo una ecuación regresiva de y=0.99x+4.0 con coeficiente de 0.998.
- 3.- Precisión:

Entre pruebas Prueba a prueba Conc. D.E. Conc. D.E. C.V.% 153 1.0 0.7 151 1.6 1.1 410 2.8 0.7 410 4.1 1.0

4.- **Especificidad:** Colesterol oxidasa no es totalmente especifica para colesterol. Otros como 7-Deshidrocolesterol. 20- Hidroxicolesterol, etc. también se oxidan. Estos análogos normalmente no significativos en suero.

REFERENCIAS:

- 1. Liberman, C, Beer. 18:1803 (1885)
- 2. Burchar, H; Chen Fentr. 61:25 (1890)
- 3. FLEGG. H, M; Ann. Clin. Biochem 10:79 (1973)
- 4. Richmond, W; Scand . J. Clin. Lab. Invest. 29: sppl, 26 Abster 3:25 (1972)
- 5. Allain, C, C; et al , Clin Chem , 20:470 (1974)
- 6. Roeschlau, p; et al, Z , Klin. Chem., Klin Biochem. 12:226 (1974)
- 7. Trinder, p. Ann. Clin, Biochem, 6.24 (1969)
- 8. Peristein, M.,T., et val , J Microchem, 22:403 (1977)
- 9. Witte ,D,L, et al , Clin Chem 20: 1282 (1974)
- 10. Young D.S. et. al, Clin. Chem. 21:ID (1975)
- National Institute of Health Publication No. 88-2926

