



TECO GRAM S.A.
Av. San Jorge 428 y 10ma.
Guayaquil - Ecuador
042396966 – 042397979 – 042396610
tecogram@gye.satnet.net

JUEGO DE REACTIVOS PARA COLESTEROL (Libre de Fenol)

JUEGO DE REACTIVOS PARA COLESTEROL (LIBRE DE FENOL)

Para la determinación cuantitativa de colesterol en suero.

INTRODUCCION

El colesterol es una sustancia grasa que se haya en la sangre, la bilis el tejido cerebral. Sirve de precursor de los ácidos biliares, esteroides y la vitamina D. La determinación del colesterol sérico es una gran ayuda en el diagnóstico y clasificación de las lipemias. Otras condiciones patológicas que influyen en los niveles del colesterol son las enfermedades hepáticas y problemas tiroideos.

Los métodos enzimáticos han reemplazado a los antiguos métodos de determinación. Allain y colaboradores desarrollaron una técnica totalmente enzimática en la cual el peróxido de hidrógeno se utiliza en la oxigenación del colesterol junto a la peroxidasa, la 4-Aminoantipirina y el fenol para formar un compuesto coloreado de quinoncimina con mayor absorbancia en el rango de lectura de 520 nm y un reductor de tensión superficial para facilitar la reacción.

PRINCIPIO

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

Colesterasa

Esteres del colesterol ----- > Colesterol + ácidos grasos

Colesterol + Oxígeno ----- > Coleter-3-ona + H₂O₂

2H₂O₂ + la 4-Aminoantipirina H. Peroxidasa
4p-HBS ----- >
Quinoincimina + 2H₂O₂
(Compuesto rojizo)

Los ésteres del colesterol son hidrolizados para producir colesterol. El peróxido de hidrógeno se produce con la oxidación del colesterol en colesterol oxidasa. Es una reacción doble catalizada por la peroxidasa. La quinoincimina de color rojiza se forma por la 4-Aminoantipirina p-HBS y Péroxido de hidrógeno. La absorción en un rango de lectura de 520 nm es proporcional a la concentración de colesterol de la muestra.

COMPOSICION DEL REACTIVO

Cuando se reconstituye tal y como se indica el reactivo de colesterol, contiene lo siguiente:

1. REACTIVO DE COLESTEROL:

(Concentración referida al reactivo reconstituido)
4-Aminoantipirina 0.6 nm, Colato de sodio 8.0 nm,
Colesterol esterasa > 150 U/L, Colesterol oxidasa > 200 U/L, p-Hidroxibenceno sulfonato 20 nm, Buffer 125 nm, pH 6.8, estabilizadores no reactivos y volumétricos.

2. ESTANDAR DEL COLESTEROL:

200 mg/dl en alcohol. Manténgase a 2 – 8°C y herméticamente cerrado.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para diagnóstico “In Vitro”.

PRECAUCION: No pipetee el reactivo reconstituido con la boca pues sus efectos son desconocidos.

2. Las muestras de suero deben considerarse infecciosas y deben manipularse adecuadamente.

3. Use agua destilada o desionizada tal y como se indica.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Manténgase el reactivo entre 2 – 8°C. El reactivo reconstituido es estable por 60 días en un frasco ámbar y a 2 – 8°C.

DETERIORO DEL REACTIVO

El reactivo debe desecharse si:

1. Presenta turbidez, la cual puede ser signo de contaminación.
2. La humedad ha penetrado en el frasco.
3. El reactivo falla en linealidad o no recobra valores normales en el rango establecido.

RECOLECCION DE LAS MUESTRAS

1. Las muestras deben ser de sueros libres de hemólisis.
2. EL colesterol en suero es estable por 7 días a temperatura ambiente (18 – 25°C) y seis meses congelado y protegido de la evaporación.

SUSTANCIAS QUE INTERFIEREN

Los anticoagulantes tales como fluoratos y los oxalatos pueden dar resultados falsos en valores bajos. La prueba no es interferida por valores de hemoglobina hasta de 10 mg/dl. La interferencia provocada por muestras ictericas o muy hemolizadas se corrige utilizando un blanco de muestra con suero o plasma.

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

1. Espectrofotómetro con capacidad de lectura a 520 nm.
2. Porta tubos
3. Pipetas de precisión.
4. Reloj.
5. Bañomaria o bloque térmico (37°C)

INSTRUCCIONES GENERALES

El reactivo de colesterol se usa tanto para procedimientos manuales como automatizados en un espectrofotómetro adecuado.

PROCEDIMIENTO MANUAL

1. Prepare el reactivo de acuerdo a las instrucciones en la etiqueta del frasco.
2. Rotule tubos: blanco, estándar, paciente, control, etc.
3. Pipetee 1.0 ml de reactivo a todos los tubos e incúbelos a 37°C durante 2 min. al menos.
4. Agregue 0.01 ml (10 ul) de muestra a los tubos respectivos, mezcle y ponga a incubar.
5. Incúbase durante 10 minutos.
6. Ajuste el espectrofotómetro a cero (0) con blanco reactivo y a 520 nm.
7. Lea y anote las absorbancias de todos los tubos.

NOTA: Si el espectrofotómetro que se usa requiere de un volumen final mayor de 1.0 ml para lecturas precisas, utilice 0.025 ml (25 ul) de muestra y 3.0 ml de reactivo.

LIMITES DEL PROCEDIMIENTO

El reactivo es lineal hasta 500 mg/dl.

1. Muestras con valores superiores a 500 mg/dl deben diluirse en 1:1 con solución salina isotónica y reanalizadas. Multiplique el resultado final por 2.
2. Los sueros muy lipémicos requieren de un “blanco muestra”. Agregue 0.02 ml (20 ul) de muestra a 2.5 ml de agua destilada, mezcle y lea la absorbancia contra agua. Reste este valor de la absorbancia del paciente para obtener lectura corregida.

CALCULOS

A = Absorbancia

$$\frac{A(\text{paciente})}{A(\text{estándar})} \times \text{Concentración de estándar} = \text{Concentración de paciente}$$

(mg/dl) (mg/dl)

Ejemplo:

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

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

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda que se incluyan controles en cada juego de reactivos. Se pueden usar material de control comercialmente disponible con valores establecidos de colesterol para control de calidad. El valor asignado del material de control debe ser confirmado por la aplicación escogida. El fracaso al obtener un rango apropiado de valores en el ensayo del material de control puede indicar deterioro del reactivo, mal funcionamiento del reactivo, o errores del procedimiento.

VALORES ESPERADOS

Se recomienda mucho que cada laboratorio establezca su propio rango normal

CLASIFICACION DE RIESGO COLESTEROL TOTAL EN SANGRE (mg/dl)

Deseable	< 200
Límite	200 – 239
Alto	≥ 240

CARACTERISTICAS DE LA PRUEBA

1. Linealidad: 500 mg/dl.
2. Comparación: Un estudio de comparación entre este procedimiento y uno que utiliza fenol libre produjo una ecuación de regresión de $Y = 0.95X + 10.3$ con una correlación de coeficiente de 0.98.
3. Precisión:

<u>Dentro de la corrida</u>		
Media (mg/dl)	S.D.	C.V.%
127	3.6	2.8
330	4.9	1.4

<u>De corrida a corrida</u>		
Media (mg/dl)	S.D.	C.V.%
130	4.7	3.6
324	8.2	2.5

4. Especificidad: La oxidasa del colesterol no es totalmente específica para el colesterol. Otros análogos del colesterol (dihidrocolesterol, 7-dehidrocolesterol, 20 hidroxicolesterol, etc.) también son oxidados. Estos análogos normalmente no aparecen en cantidades apreciables en el suero.