

INSTITUTO DE CARDIOLOGIA Y CIRUGIA CARDIOVASCULAR

Micrométodo para la determinación del colesterol total

Dr. Daniel Sánchez Serrano, Dr. Marcelino Lavín Palmieri, Lic. Teresita Céspedes Cabrera, Téc. Ana M. Maltas Pineda

Sánchez Serrano, D. y otros: *Micrométodo para la determinación del colesterol total.*

Se describe un micrométodo para la determinación del colesterol total en suero o plasma, basado en el de Abell y colaboradores. El método mostró una buena correlación con el original ($r = 0,95$) y un buen coeficiente de variación para la repetibilidad (5,6%) y para la reproducibilidad (2,8%). Se recomienda por el pequeño volumen de muestra requerida (0,1 ml) y por el bajo consumo de reactivos.

INTRODUCCION

Múltiples factores importantes se han identificado para predecir el riesgo de aterosclerosis de los vasos sanguíneos. De ellos, la determinación del colesterol total (CT) en el suero o plasma fue uno de los primeros, con una correlación positiva entre las cifras encontradas y la incidencia de esta enfermedad.¹ Estudios posteriores demostraron que la cuantificación del colesterol en las diferentes fracciones de lipoproteínas (Col-LDL, Col-HDL y Col-VLDL), así como diferentes cocientes entre las mismas, constituían índices pronósticos más eficientes.²

En cualquier caso, la determinación del colesterol es necesaria y para ello se requiere un método que reúna las condiciones de especificidad, sensibilidad, reproducibilidad y repetibilidad requeridas.

Durante mucho tiempo, antes de la aparición de los métodos enzimáticos, uno de los procedimientos de elección fue el de Abell y colaboradores,³ que, incluso, fue recomendado por la OMS en la determinación del CT. En la actualidad, este método sigue utilizándose cuando existen interferencias con los enzimáticos o en aquellos lugares donde estos últimos no son accesibles.

Como quiera que el método original utiliza volúmenes de muestras relativamente grandes (0,5 ml) y consume cantidades apreciables de reactivos, nos dimos a la tarea de evaluar un micrométodo que, sin perder las cualidades del original, obviara estas dificultades.

MATERIAL Y METODO

REACTIVOS

Se utilizó hidróxido de potasio (KOH), etanol absoluto, éter de petróleo 60-80 °C, anhídrido acético, ácido acético glacial, ácido sulfúrico concentrado (99%) y colesterol. Todos los reactivos fueron de grado analítico y ninguno se recrystalizó o se redestiló antes de su uso. Las soluciones acuosas se prepararon con agua destilada.

SOLUCIONES

1. Solución de KOH al 33%: 33 g de KOH se disolvieron y se completó hasta 100 ml con agua destilada.
2. Reactivo de color: 20 volúmenes de anhídrido acético frío, 1 volumen de ácido sulfúrico concentrado y 10 volúmenes de ácido acético glacial. Se utilizó dentro de la hora que sigue a su preparación.
3. Solución patrón de colesterol: 50 mg de colesterol se disolvieron en etanol absoluto y se llevaron a 100 ml (1,29 mmol/l).

PROCEDIMIENTO	Patrón	Muestra
Suero o plasma	—	0,1 ml
Solución patrón	1,0 ml	—
KOH 33%	0,05 ml	0,05 ml
Etanol absoluto	—	1,00 ml
Agua destilada	0,1 ml	—

Se agitó por espacio de 10 segundos en tubos de 13 X 100 mm sin tapa y se colocó en baño de María a 37 °C por no menos de 55 minutos. En el caso del patrón, se utilizaron 3 tubos (para 3 diferentes concentraciones) y tanto las muestras como los patrones fueron procesados por duplicado.

Después de la incubación se añadió a cada tubo 1,5 ml de éter de petróleo 60-80 °C y se agitó por 10 segundos. Se añadió entonces, 0,5 ml de agua destilada y se repitió la agitación por 10 segundos, se dejaron los tubos en reposo hasta la separación de las fases.

De la fase superior de las muestras, se pasó 1,0 ml a tubos limpios de 15 X 150 mm y, de los patrones, 0,3-0,6 y 0,9 ml por duplicado que corresponden a $2,58 \times 10^{-3}$; $5,17 \times 10^{-3}$ y $7,76 \times 10^{-3}$ mmol de colesterol, respectivamente. Se evaporó la fase de éter de petróleo en un baño de María entre 90 y 100°C. Después de la evaporación completa del éter de petróleo (entre 10 y 20 minutos), los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y a cada uno de ellos se le añadió 3,0 ml de reactivo de color, se agitó y dejó en la oscuridad durante 30 minutos. Se determinaron las densidades ópticas (DO) a 620 nm en cubetas de cristal de 1 cm de paso de luz, a las muestras y patrones leídos contra el blanco reactivo, que fue el mismo reactivo de color.

La concentración del colesterol se calculó en las muestras según el método original:³

$$\text{Colesterol total (mmol/l)} = \frac{\text{Volumen de éter de petróleo} \times 2,586}{S \times \text{Vol. éter de pet. desecado} \times \text{Vol. muestra}}$$
$$S = \frac{\text{D O cada patrón}}{\text{Cantidad de colesterol desecado de la fase éter de cada patrón en mg}}$$

El valor 2,586 proviene de multiplicar el factor de conversión a *mmol/l* (0,02586) por 100 en la fórmula original.

Si todas las *S* calculadas son aproximadamente iguales, puede utilizarse un promedio; si difieren en $\pm 0,3$, tomar para el cálculo el patrón cuya *DO* se aproxime más a la de la muestra.

ESPECIFICIDAD

Para probar la especificidad del método se utilizaron 10 muestras diferentes, en las que se determinó el colesterol total por el método original y por el micrométodo; se calculó el coeficiente de correlación, *r*. Además, en otras 10 muestras el colesterol fue determinado por los métodos anteriores y por el enzimático CHOD-PAP de la firma Boehringer-Manheim. Se halló la correlación entre los diferentes métodos.

REPETIBILIDAD

Se determinó el colesterol total por el micrométodo a 10 alícuotas de una muestra en forma simultánea. Se calculó el coeficiente de variación y se aceptó un valor del 5 % o menos como satisfactorio.

REPRODUCIBILIDAD

Alícuotas de una misma muestra fueron congeladas. Dicha muestra procesada por duplicado durante 10 días consecutivos. Cada alícuota fue descongelada y utilizada una sola vez. Se empleó el mismo criterio utilizado en la *repetibilidad* para el coeficiente de variación.

LINEALIDAD

Se preparó un patrón de colesterol (150 *mg* hasta 100 *ml* con etanol absoluto), cuya concentración fue de 3,88 *mmol/l*. De la fase éter de petróleo para evaporar, se tomaron los siguientes volúmenes por duplicado: 0,5; 0,10; 0,20 y 0,30 *ml*, que correspondieron a concentraciones de colesterol de 1,94; 3,88; 7,76 y 11,64 *mmol/l*.

RECUPERACION

Se utilizó el patrón de 3,88 *mmol/l* y se preparó adicionalmente una solución de colesterol 0,129 *mmol* en cloroformo. Todas las alícuotas fueron procesadas por cuadruplicado. Cuatro tubos de ensayo contenían 0,1 *ml* de la solución patrón 3,88 *mmol/l* y los 16 restantes 0,2; 0,4; 0,8 y 2,6 *ml* de la solución de colesterol, en cloroformo

solamente; las alícuotas de cloroformo fueron evaporadas en baño de María a 100°C y después de alcanzar la temperatura ambiente se añadió a estos tubos 0,1 ml de la solución patrón 3,88 mmol/l. A todos los tubos se añadió 0,9 ml de etanol absoluto y 0,05 ml de KOH al 33%. En lo adelante, el método fue aplicado en la forma descrita antes.

Con este procedimiento se lograron concentraciones variables y crecientes de colesterol 3,88; 4,14; 4,39; 4,91 y 5,94 mmol/l correspondientes a la adición de 0,0; 0,026; 0,052; 0,103 y 0,206 mmoles de colesterol.

RESULTADOS Y DISCUSION

El método de Abell y colaboradores para la determinación del colesterol total posee una excelente especificidad (99%).⁴

La correlación hallada entre éste y el micrométodo ($r = 0,95$) corresponde a un nivel de significación de $p < 0,001$, de lo cual se infiere que este último conserva una buena especificidad. Adicionalmente, en otra serie de 10 muestras, la correlación entre el método enzimático y el micrométodo fue de $r = 0,96$ para un nivel de significación $p < 0,001$, lo cual sustenta adicionalmente su especificidad.

Los coeficientes de variación obtenidos para la *reproducibilidad* y la *repetibilidad*, el 2,8 y 5,6 %, respectivamente, se encuentran dentro de los rangos permisibles para los métodos de utilización en el laboratorio clínico.⁵

Se estudió el rango de concentraciones de colesterol para el cual el micrométodo mantenía linealidad con las DO obtenidas.

Se escogió un rango de concentraciones entre 1,94 y 11,64 mmol/l. En la figura pueden apreciarse los resultados. El procedimiento propuesto mostró linealidad en el rango de concentraciones utilizado.

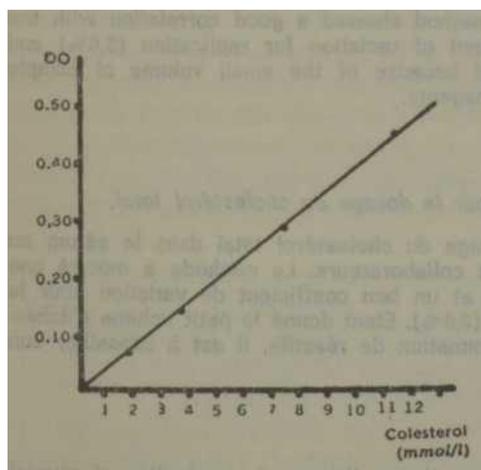


Figura. Sensibilidad del micrométodo propuesto para la determinación del colesterol total en suero o plasma.

Los resultados del experimento de *recuperación* aparecen en la tabla. Ellos muestran una buena recuperación en el rango escogido, que abarca sólo el rango considerado "normal".

Tabla. *Recuperación del colesterol añadido a 0,1 ml de patrón 3,88 mmol/l. (Valores presentados x + DS n = 4)*

Colesterol añadido (mmol)	DO	Colesterol total (mmol/l)	Colesterol recuperado (% recuperación)
0,0	0,164 ± 0,004	3,78 ± 0,05	0,0
0,026	0,174 ± 0,011	4,19 ± 0,21	97,5
0,052	0,184 ± 0,006	4,39 ± 0,24	97,5
0,103	0,208 ± 0,016	4,94 ± 0,25	100,5
0,206	0,250 ± 0,014	6,41 ± 0,09	107,5

En los resultados puede observarse que la máxima diferencia entre el colesterol añadido y el recuperado fue de un 7,5%, es decir, 0,19 mmol de colesterol por cada 2,59 mmol. Si se tiene en cuenta que el método original sólo puede detectar diferencias de 0,26 mmol o más entre muestras, este porcentaje de recuperación puede aceptarse como bueno.

El estudio de la *especificidad, reproducibilidad, repetibilidad, linealidad y recuperación* del método propuesto nos permite recomendar el uso del mismo, pues los resultados obtenidos no difieren de los registrados para el método original.

SUMMARY

Sánchez Serrano, D. et al.: *Micromethod for determination of total cholesterol.*

A micromethod for determination of total cholesterol in serum or plasma, based on that of Avell and coworkers, is described. The method showed a good correlation with the original one ($r = 0,95$) and a fine coefficient of variation for replication (5,6%) and reproductiveness (2,8%). It is recommended because of the small volume of sample required (0,1 ml) and low consumption of reagents.

RÉSUMÉ

Sánchez Serrano, D. et al.: *Microméthode pour le dosage du cholestérol total.*

Il est décrit une microméthode pour le dosage du cholestérol total dans le sérum ou dans le plasma, fondée sur celle d'Avell et collaborateurs. La méthode a montré une bonne corrélation avec l'original ($r = 0,95$) et un bon coefficient de variation pour la répétabilité (5,6%) et pour la reproductibilité (2,8%). Etant donné le petit volume d'échantillon nécessaire (0,1 ml) et la faible consommation de réactifs. Il est à conseiller son emploi.

BIBLIOGRAFIA

1. Kannel, W. B. et al.: Risk factors In coronary heart disease -An evaluation of several serum lipids as predictor of coronary heart disease. The Framingham Study. Ann Intern Med 61: 888-899, 1964.

2. *Wayne, T. f.; P. Alaupovic; M. O. Curry; E. T. Lee; P. S. Anderson; E. Schechter*: Plasma apolipoprotein B and VLDL-, LDL-, and HDL-Cholesterol as risk factors In the development of coronary artery disease in male patients examined by angiography. *Atherosclerosis* 39: 411-424, 1981.
3. *Abell, L. L.; B. B. Levy; B. B. Brodle; F. E. Kendall*: Cholesterol in Serum. *Standard Methods of Clinical Chemistry*. Vol. 2. New York, N. Y., Ed. Academic Press INC., 1958. Pp. 26-33.
4. *Craig, L. C.; C. Golumbic; H. Mlghton; E. Titus*: Identification of small amounts of organics compounds by distribution studies III. Use of buffers in conuntercurrent distribution. *J Biol Chem* 161: 321-332, 1945.
5. *Thiel mann, K.*: Principios de Metodología en Bioquímica Clínica. Ciudad de La Habana, Ed. Organismos, Instituto Cubano del Libro, 1973. Pp. 62-63.

Recibido: 3 de diciembre de 1985

Aprobado: 8 de diciembre de 1985

Dr. Daniel Sánchez Serrano
Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular
Calle 17 y A.
Vedado
Ciudad de La Habana 4
Cuba