

INSTITUTO "LOPEZ-NEYRA" DE PARASITOLOGIA (CSIC).
UNIDAD DE BIOQUIMICA. GRANADA.

"ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE LA MEDIDA DE LA
ACTIVIDAD COLINESTERASA ERITROCITARIA HUMANA POR LA
TECNICA DEL pH-STAT".

García-López, J.A. y Monteoliva, M.

RESUMEN

Se presenta el resultado de un control de calidad intralaboratorio aplicado a la determinación de la actividad colinesterasa eritrocitaria humana por la técnica del pH-stat. Se pone de manifiesto la necesidad de realizar este tipo de controles, sobre todo cuando se utiliza la actividad colinesterasa como indicador de contaminación por plaguicidas organofosforados, lo que requiere el análisis continuado de un elevado número de muestras. Igualmente se estudia la influencia del tiempo de medida en la actividad colinesterasa y se confirma la concentración óptima de sustrato.

SUMMARY

It has been presented an intralaboratory quality control result to the determination of the human erythrocytes cholinesterase activity by the pH-stat technique. It indicated the necessity of carrying out these controls mainly when the cholinesterase activity is used as indicator of the organophosphorus plaguicides pollution, what requires the continued analysis of a high samples number. It has similarly been studied the influence of measure time in the cholinesterase activity and the best concentration of substrate is confirmed.

INTRODUCCION

La colinesterasa eritrocitaria o verdadera es un enzima que se encuentra en nervios, músculos, glóbulos rojos y unión neuromuscular (1). Su función principal es la inactivación del transmisor neuromuscular acetilcolina (2). La medida de la actividad colinesterasa es el método más práctico de que se dis-

pone en la actualidad para evaluar el grado de exposición a los plaguicidas organofosforados (3), siendo la medida en hematies un indicador de intoxicación más significativo que la medida en plasma (4).

Numerosos son los métodos descritos para determinar la actividad colinesterasa. De todos los métodos propuestos, el método del pH-stat (5) ha conseguido una gran aceptación por su rapidez y exactitud (6), estando particularmente indicado en estudios de inhibición por su alta precisión y sensibilidad (7, 8).

El control de contaminación ambiental a través de la medida de la actividad colinesterasa en muestras biológicas, requiere el análisis continuado de un elevado número de muestras. Esto nos obliga a controlar la calidad de los resultados, puesto que las técnicas enzimáticas están sujeta a muchas variables continuas que pueden inducir a un error en los resultados.

En este trabajo presentamos el resultado del control de calidad de la medida de la actividad colinesterasa eritrocitaria realizado a lo largo de un estudio sobre la contaminación ambiental por plaguicidas organofosforados en la provincia de Granada. Igualmente estudiamos la influencia del tiempo de medida en la actividad colinesterasa y confirmamos la concentración óptima de sustrato.

MATERIAL Y METODOS

A lo largo de los 131 días de medida que ha supuesto nuestro estudio hemos empleado tres pool de hematies humanos, de distinta actividad, que hemos utilizado como control de calidad. Estos pool se han obtenido mezclando distintas muestras de sangre total recogidas en el laboratorio de Análisis Clínicos del Ambulatorio de "Gran Capitán" de Granada.

Cada pool de sangre total se lava tres veces con solución salina y se resuspenden en, aproximadamente, su mismo volumen con solución salina. Con el fin de liberalizar el enzima del estroma de los hematies, se someten a ultrasonidos en un sonicador MSE 1300, aplicando tres períodos ultrasónicos de 30 segundos con descansos intermedios de 1 minuto. El lisado de hematies se reparte en viales a razón de 0,5 ml de muestra por vial y se liofilizan en un liofilizador Edwards, conservándose posteriormente a 4°C.

Paralelamente a las medidas diarias se mide la actividad de uno de los pool, cuando no de dos. La actividad colinesterasa se ha determinado por la técnica del pH-stat (5). Esta técnica está basada en la neutralización automática con hidróxido sódico 0,001 N del ácido acético que se libera en la hidrólisis enzimática del sustrato de acetilcolina a pH constante e igual a 8. La actividad colinesterasa viene expresada en μ moles de sustrato hidrolizados por minuto y ml.

RESULTADOS

En la Tabla I se indican los valores diarios de actividad colinesterasa de los tres pool de hematies utilizados como control de calidad. Los valores medios de actividad obtenidos con las 30 primeras determinaciones de cada pool se indican en la Tabla II, así como los límites permisibles de error de $\bar{X} \pm 2S$. Los coeficientes de variación obtenidos oscilan entre 3,79 y 6,49 %.

TABLA I

ACTIVIDAD COLINESTERASA ERITROCITARIA HUMANA DE LOS POOL
"CONTROL DE CALIDAD"

POOL 1		POOL 2		POOL 3	
1.- 3,983	44.- 3,864	1.- 5,461	44.- 6,148	1.- 3,740	
2.- 3,489	45.- 4,272	2.- 5,285	45.- 5,687	2.- 3,472	
3.- 4,127	46.- 3,830	3.- 5,145	46.- 5,996	3.- 3,385	
4.- 4,034	47.- 4,313	4.- 5,837	47.- 5,599	4.- 3,340	
5.- 4,243	48.- 4,099	5.- 5,256	48.- 5,848	5.- 3,227	
6.- 3,786	49.- 3,978	6.- 5,168	49.- 5,672	6.- 3,371	
7.- 3,757	50.- 3,938	7.- 5,689	50.- 5,522	7.- 3,645	
8.- 3,933	51.- 4,077	8.- 5,556	51.- 5,467	8.- 3,439	
9.- 3,514	52.- 3,932	9.- 4,962	52.- 5,350	9.- 3,530	
10.- 4,020	53.- 3,882	10.- 4,842	53.- 5,835	10.- 3,520	
11.- 4,158	54.- 3,834	11.- 5,062	54.- 5,450	11.- 3,579	
12.- 3,942	55.- 4,063	12.- 5,172	55.- 5,312	12.- 3,877	
13.- 3,621	56.- 3,654	13.- 5,587	56.- 5,322	13.- 3,696	
14.- 4,170	57.- 3,883	14.- 5,223	57.- 5,383	14.- 3,257	
15.- 4,044	58.- 3,922	15.- 5,241	58.- 5,354	15.- 3,749	
16.- 3,846	59.- 3,941	16.- 5,593	59.- 5,397	16.- 3,402	
17.- 3,413	60.- 4,161	17.- 5,219	60.- 5,032	17.- 3,418	
18.- 3,670	61.- 3,726	18.- 5,610	61.- 5,201	18.- 3,303	
19.- 3,830	62.- 3,858	19.- 5,369	62.- 5,461	19.- 3,413	
20.- 3,684	63.- 3,837	20.- 5,275	63.- 5,530	20.- 3,468	
21.- 3,739	64.- 3,663	21.- 5,137	64.- 5,509	21.- 3,376	
22.- 4,194	65.- 3,788	22.- 5,338	65.- 5,600	22.- 3,192	
23.- 4,135	66.- 3,757	23.- 5,079	66.- 5,183	23.- 3,598	
24.- 4,129	67.- 3,889	24.- 5,051	67.- 5,268	24.- 3,520	
25.- 4,040	68.- 3,918	25.- 5,155	68.- 5,758	25.- 3,521	
26.- 4,248	69.- 3,678	26.- 5,132	69.- 5,442	26.- 3,309	
27.- 4,223	70.- 3,573	27.- 5,036	70.- 5,616	27.- 3,378	
28.- 4,289	71.- 3,847	28.- 4,927	71.- 5,513	28.- 3,467	
29.- 4,166	72.- 4,128	29.- 4,799	72.- 5,455	29.- 3,536	
30.- 4,329	73.- 3,831	30.- 4,906	73.- 5,504	30.- 3,666	
31.- 3,830	74.- 3,807	31.- 4,796	74.- 5,560		
32.- 3,966	75.- 3,833	32.- 4,985	75.- 5,367		
33.- 3,545	76.- 3,635	33.- 4,924	76.- 5,593		
34.- 3,840	77.- 3,983	34.- 5,250	77.- 5,371		
35.- 3,944	78.- 4,333	35.- 5,734	78.- 5,502		
36.- 4,017	79.- 4,140	36.- 5,488			
37.- 3,621	80.- 4,076	37.- 5,216			
38.- 3,744	81.- 4,128	38.- 5,930			
39.- 3,757	82.- 4,133	39.- 5,757			
40.- 3,814	83.- 3,981	40.- 5,682			
41.- 3,773		41.- 5,371			
42.- 3,729		42.- 5,712			
43.- 4,011		43.- 5,732			

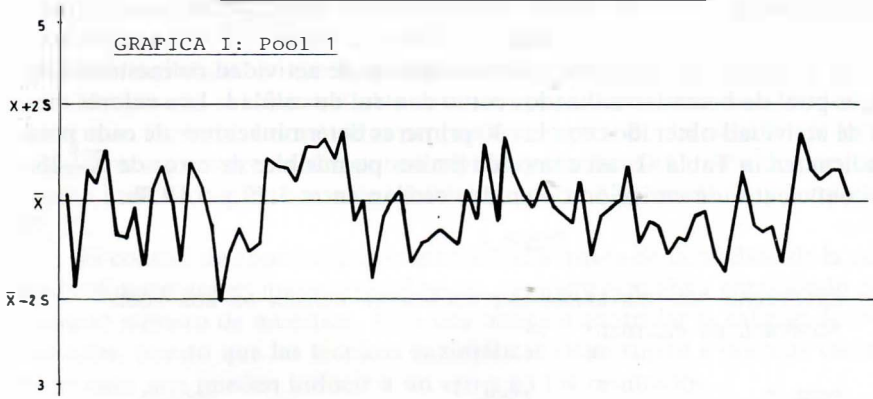
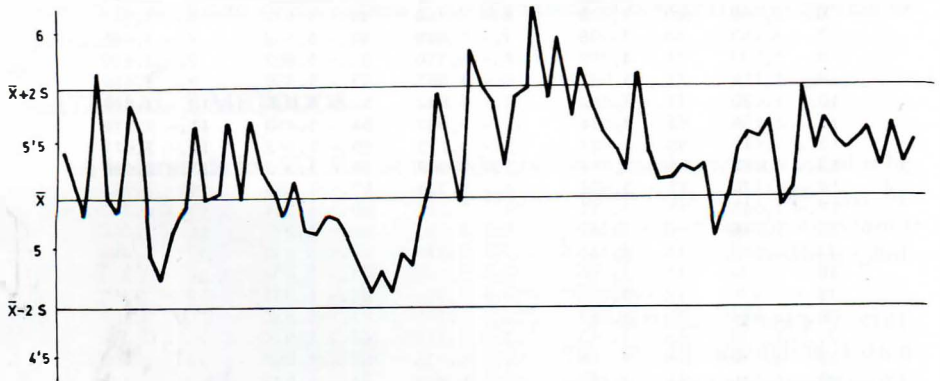
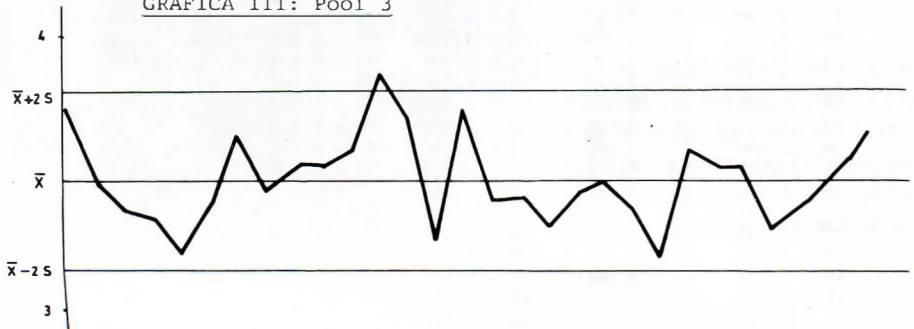
GRAFICAS DE CONTROL DE VALORES MEDIOSGRAFICA I: Pool 1GRAFICA II: Pool 2GRAFICA III: Pool 3

TABLA II

ACTIVIDAD COLINESTERASA MEDIA DE LOS POOL "CONTROL DE CALIDAD"

POOL	N	\bar{X}	S	$\bar{X} + 2S$	$\bar{X} - 2S$	C.V.
1	30	3,958	0,257	4,472	3,444	6,49
2	30	5,237	0,258	5,753	4,721	4,92
3	30	3,452	0,131	3,714	3,190	3,79

N: número de ensayos; \bar{X} : media aritmética; S: desviación standard; C.V.: coeficiente de variación.

TABLA III

ACTIVIDAD COLINESTERASA A DISTINTOS TIEMPOS

TIEMPO (minutos)	1	2,8	3	7
	5,088	5,034	5,130	5,225
	5,136	5,354	5,194	5,321
	5,328	5,102	5,306	5,072
	4,976	4,524	4,611	5,353
	5,120	5,335	5,256	5,211
	4,854	5,097	5,082	4,890
	5,256	5,058	4,776	5,001
	4,968	5,213	4,876	4,961
	4,968	4,994	4,926	4,960
	5,274	4,667	5,232	4,990
N	10	10	10	10
\bar{X}	5,096	5,037	5,039	5,095
S	0,156	0,264	0,231	0,169

$$F_{\text{exp}} = 0,250; \alpha = 0,1 \quad \text{————} \quad \text{N.S.}$$

N: número de ensayos; \bar{X} : media aritmética;
 S: desviación standard; F_{exp} = F de Snedecor;
 α : error: N.S.: no significativo.

TABLA IV

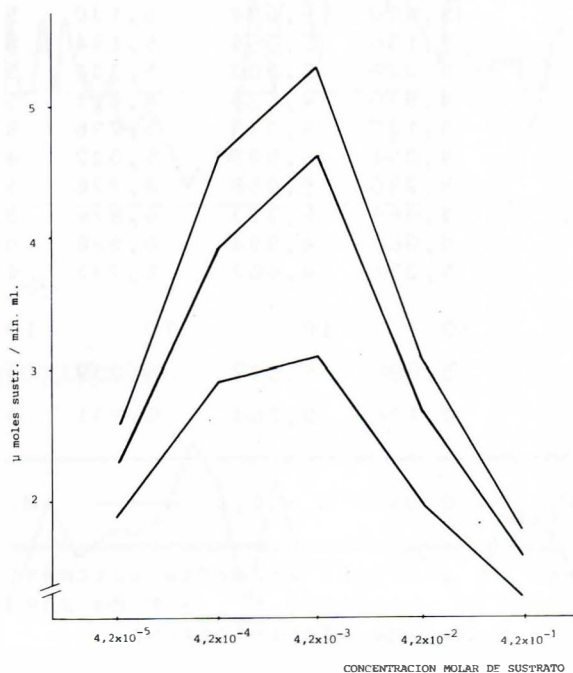
ACTIVIDAD COLINESTERASA ERITROCITARIA HUMANA SEGUN LA CONCENTRACION DE SUSTRATO

CONCENTRACION MOLAR		$0,11 \times 10^{-2}$	$0,11 \times 10^{-1}$	$0,11 \times 10^0$	$0,11 \times 10^1$	$0,11 \times 10^2$
Pool 1	N	3	3	3	3	3
	\bar{X}	1,990	2,929	3,177	2,051	1,394
	S	0,091	0,083	0,017	0,068	0,020
Pool 2	N	3	3	3	3	3
	\bar{X}	2,617	4,669	5,349	3,129	1,809
	S	0,101	0,083	0,064	0,074	0,013
Pool 3	N	3	3	3	3	3
	\bar{X}	2,373	3,981	4,621	2,786	1,636
	S	0,050	0,059	0,098	0,018	0,038

N: número de ensayos; \bar{X} : media aritmética; S: desviación standard.

GRAFICA IV

ACTIVIDAD COLINESTERASA SEGUN LA CONCENTRACION DE SUSTRATO



Los valores diarios de actividad de cada uno de los tres pool se representan en las Gráficas I, II y III, en las que se indica el límite permisible de error.

La Tabla III indica los valores de actividad colinesterasa a distintos tiempos de medida. Se han realizado 10 determinaciones del mismo pool a distintos tiempos y el análisis de varianza no pone de manifiesto que existan diferencias significativas de actividad entre 7 y 1 minuto.

En la Tabla IV y Gráfica IV se indican y representan las variaciones de actividad colinesterasa de tres pool de hematies, según la concentración de sustrato cloruro de acetilcolina. Se han utilizado soluciones de acetilcolina desde $0,11 \times 10^2 M$ hasta $0,11 \times 10^{-2} M$.

DISCUSION

La necesidad de un programa de control de calidad en la medida de la actividad colinesterasa sanguínea como índice de contaminación por plaguicidas organofosforados ha sido indicada por diversos autores (9). De los diversos métodos descritos para desarrollar un sistema de control de calidad estadístico, el más satisfactorio y eficaz, en estos momentos, es el de las gráficas de control de valores medios, que es el empleado por nosotros.

La muestra control utilizada ha sido pool de hematies, sometidos a los mismos pasos de la técnica analítica que las muestras problema. Los pool de hematies han sido conservados liofilizados, que es el mejor medio de estabilizar las actividades enzimáticas. Reconstruidos los viales no se han utilizado después de 8 horas.

Cuando se realizan las 30 primeras determinaciones de cada pool se calcula su media (\bar{x}), desviación standard (S) y coeficiente de variación (CV). Hemos fijado como límite permisible de error la $\bar{x} \pm 2S$, en el que deberán estar el 95 % de los valores de acuerdo con la distribución normal según Gauss. En líneas generales se acepta que un proceso analítico enzimático es bueno y por consiguiente utilizable cuando el CV no es superior al 10 %. Con ninguno de los tres pool utilizados hemos obtenido CV superiores al 10 %.

Los límites permisibles de error fijados, nos sirven para controlar diariamente las gráficas control. Cuando la actividad colinesterasa cae fuera de los límites fijados, se desechan todas las medidas realizadas ese día y se repiten al siguiente. Las gráficas de control diario nos pueden reflejar errores analíticos tales como valores individuales lejos de los límites de confianza, tendencias, desplazamientos, etc.

Al no poder participar nuestro laboratorio en un programa de control de calidad interlaboratorios, nuestros resultados ratifican la necesidad de realizar un control de calidad intralaboratorio de la medida de la colinesterasa sanguínea, ya que nos ha permitido detectar errores al obtener medidas que caían fuera de los límites de confianza preestablecidos.

El estudio de la influencia del tiempo de medida en la actividad colinesterasa nos ha permitido reducir considerablemente la duración de la técnica al no encontrar diferencias significativas de actividad cuando ésta se mide a 7 o a 1 minuto.

Las concentraciones finales de sustrato en el vaso de reacción, teniendo en cuenta que la técnica analítica emplea 4,5 ml de solución salina, 0,5 ml de muestra y 0,2 ml de cloruro de acetilcolina, están comprendidas entre $4,2 \times 10^{-1}M$ y $4,2 \times 10^{-5}M$, resultando ser $4,2 \times 10^{-3}M$ la concentración óptima de sustrato, resultado concordante con el de otros autores (6, 10). La representación gráfica de estos valores nos pone de manifiesto una inhibición por exceso de sustrato, lo que es característico de la colinesterasa verdadera presente en los hematies (5).

BIBLIOGRAFIA

- (1) NACHMANSOHN, D. y MEYERHOF, B. J. *Neurophysiol.* 4. 348-354. (1941).
- (2) STECK, T. J. *Cell. Biol.* 62. 1-19 (1974).
- (3) OMS: Límites recomendados por razones de salud en la exposición profesional a los plaguicidas. Ginebra. Serie de Informes Técnicos N.º 677. (1982). 114-116.
- (4) CHAUHAN, U., RASTOGI, V., JAGGI, C. y SARKAR, B. *Ind. J. Experim. Biol.* 11. 576-578 (1973).
- (5) NABB, D. y WHITFIELD, F. *Arch. Environ. Health.* 15. 147-154 (1967).
- (6) ALDRICH, F., WALKER, G. y PATNOE, C. *Arch. Environ. Health.* 19. 617-620 (1969).
- (7) STAVINOHA, W., RYAN, L. y ENDECOTT, B. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 14. 469-474. (1969).
- (8) WARNER, B., BOEHME, G., URDEA, M., POOL, K. y LEGG, J. *Anal. Biochem.* 106. 175-185 (1980).
- (9) SERAT, F. y MENGLE, D. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 9. 24-27 (1973).
- (10) DAVIDSON, P. *Toxicol.* 5. 113-115 (1975).