

## Inactivación del virus de la inmunodeficiencia humana mediante calentamiento del suero a 56 °C. Efecto sobre la determinación de diversas magnitudes enzimáticas e inmunológicas

R. Hernández-García, J. Jaqueti Aroca, D. Martínez-Hernández, C. Rubio Valor, M.<sup>a</sup>J. Mata Gil, F. Navarro-Gallar

Laboratorio Central, Hospital del Aire, Madrid.  
Recibido 8-10-90  
Aceptado 4-12-90

Los sueros de pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana representan un elevado riesgo para el personal de los laboratorios de análisis clínicos. El Advisory Committee on Dangerous Pathogen's aconseja que las determinaciones analíticas automatizadas se realicen en analizadores fácilmente desinfectables.

A pesar del riesgo, algunas determinaciones analíticas siguen realizándose de forma manual, ya sea por dificultades en la automatización, razones económicas u otras.

Para evitar el riesgo de infección por el virus de la inmunodeficiencia humana que representa el manejo de estos sueros, se ha propuesto la inactivación de dicho virus mediante calentamiento del suero a 56 °C, antes del análisis de los especímenes<sup>(1-3)</sup>. Sin embargo, la inactivación por calor reduce generalmente la concentración catalítica de la mayoría de las enzimas séricas.

En nuestro laboratorio hemos sometido 32 sueros a una temperatura de 56 °C, durante 1 h, y hemos estudiado las variaciones en la concentración catalítica de varias enzimas (aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa, creatina quinasa,  $\gamma$ -glutamyltransferasa, lactato deshidrogenasa,  $\alpha$ -amilasa y fosfatasa alcalina), cuyo uso clínico es sobradamente conocido. Además, hemos incluido en el estudio la enzima adenosina desaminasa, una enzima del metabolismo de las purinas esencial en la diferenciación de los linfocitos T<sup>(4)</sup>, de especial interés en la monitorización del síndrome de inmunodeficiencia adquirida<sup>(5)</sup>.

Mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov se comprobó que, en todas las enzimas estudiadas, los valores obtenidos se ajustaron a una distribución de Gauss. Los resultados se expresan en la Tabla I. La comparación de resultados se realizó mediante la prueba de la *t* de Student.

Igualmente, hemos estudiado los efectos del calentamiento en la determinación de inmunoglobulinas G, A

**Tabla I**  
**Concentraciones catalíticas séricas de las enzimas estudiadas antes y después de la inactivación por calentamiento (1 h a 56 °C), en  $\mu$ katal/L**

	Basal		60 minutos		Variación	
	$\bar{x}$	<i>s</i>	$\bar{x}$	<i>s</i>	(%)	<i>P</i>
Aspartato aminotransferasa	0,37	0,09	0,34	0,08	- 8,9	<0,001
Alanina aminotransferasa	0,32	0,09	0,13	0,04	-60,8	<0,001
$\gamma$ -Glutamyltransferasa	0,29	0,16	0,26	0,14	-10,9	<0,05
Lactato deshidrogenasa	2,84	0,53	1,84	1,02	-35,3	<0,001
Creatina quinasa	1,38	0,49	0,10	0,02	-92,6	<0,001
$\alpha$ -Amilasa	1,34	0,63	1,36	0,65	+ 1,2	<0,01
Fosfatasa alcalina	1,30	0,28	0,07	0,02	-94,9	<0,001
Adenosina desaminasa	0,22	0,06	0,12	0,04	-46,2	<0,001

**Tabla II**  
**Concentraciones séricas (g/L) de las inmunoglobulinas y de los componentes del complemento estudiados antes y después de la inactivación por calentamiento (1 h a 56 °C)**

	Basal		60 minutos		Variación	
	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	(%)	P
	IgA	2,30	1,14	2,03	1,02	-11,7
IgG	11,81	3,46	10,93	3,02	- 7,4	<0,001
IgM	1,17	0,42	1,01	0,38	-13,5	<0,001
C3	0,98	0,22	0,65	0,15	-32,9	<0,001
C4	0,31	0,09	0,27	0,09	-11,1	<0,001

y M, y de las fracciones del complemento C3 y C4, mediante la técnica LAPIA (*Latex Agglutination Photometric Immuno Assay*)<sup>(6-7)</sup>, utilizando un analizador inmunológico LA-2000 (Eiken Chemical Co. Ltd., Tokio, Japón)<sup>(8)</sup>.

Como anteriormente, todos los valores se ajustaron a una distribución de Gauss. Los resultados obtenidos se reflejan en la Tabla II.

Se observa una disminución significativa de la concentración catalítica en las enzimas estudiadas, con la excepción de la  $\alpha$ -amilasa. De igual forma, se aprecian disminuciones significativas en las concentraciones de IgG, IgA, IgM, C3 y C4. A la vista de estos datos, consideramos que la inactivación del virus de la inmunodeficiencia humana por calentamiento del suero a 56 °C durante 1 h no resulta útil, ya que invalida los resultados de la gran mayoría de las magnitudes bioquímicas estudiadas.

#### Bibliografía

- Goldie DJ, McConnell AA, Cooke PR. Heat treatment of whole blood and serum before chemical analysis. *Lancet* 1985; 1: 1161.
- Lai L, Ball G, Stevens J, Shanson D. Effect of heat treatment of plasma and serum on biochemical indices. *Lancet* 1985; 1: 1457-1458.
- Montani A, Vimercati ME. Effect of heat inactivation of HIV on laboratory results. *Clin Chem* 1987; 33: 1474-1475.
- Shore A, Dosch HM, Geldfand EW. Role of adenosine deaminase in the early stages of precursor T cell maturation. *Clin Exp Immunol* 1981; 44: 152-155.
- Martínez-Hernández D, Arenas-Barbero J, Navarro-Gallar F, García-Esteban R, Santos-Sancho JM, Gómez-Terrenos FJ. Adenosine deaminase in the acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Chem* 1988; 34: 1949.
- Fenili D, Regonesi C, Giuliani G, Biffi M. La tecnica «Latex immunoassay». *J Clin Immunoassay* (ed. italiana) 1988; 7: 1-6.
- Tsubota N. Applicazione della reazione di agglutinazione al lattice per un'analisi quantitativa. *J Clin Immunoassay* (ed. italiana) 1988; 7: 7-15.
- Kakishima H, Umezawa K, Kubota N, et al. Study on latex agglutination photometric assay with LA-System (Automatic Immunochemical Analyser). *JJCLA* 1983; 8: 156-160.

## Efecto de la temperatura y de la fracción lábil en diferentes métodos cromatográficos para la determinación de glicohemoglobina

F. Javier Gella, Laureano Taberner, Guillermo García

BioSystems S.A.  
 Costa Brava 30  
 08030 Barcelona  
 Recibido: 18-2-91  
 Aceptado: 11-3-91

En un reciente trabajo publicado en esta revista por P. Rosel y col. (1) se estudia el efecto de la temperatura y la fracción lábil en diferentes métodos cromatográficos para la determinación de glicohemoglobina.

Aunque el efecto de la fracción lábil (aldimina) en las técnicas de cromatografía de intercambio iónico es clara y bien documentada (2-4), no parece que esta fracción interfiera cuando se utiliza el procedimiento de cromatografía de afinidad (5-7). Desafortunadamente, no queda claro en el trabajo como eliminan los autores la fracción lábil. En el caso de la cromatografía de intercambio iónico se cita un reactivo de semicarbazida-anilina, posiblemente preparado por los autores, ya que no coincide con el suministrado en el equipo de reactivos. En los demás casos no se especifica si se realizó el mismo procedimiento. Por otra parte, parece que existe un error de imprenta en la Tabla I del trabajo citado para algún valor de desviación estándar, que hace los datos incomprensibles.

Es conocido el efecto de la temperatura sobre algunos procedimientos que utilizan la cromatografía de intercambio iónico para separar la glicohemoglobina (8). El valor obtenido *aumenta* proporcionalmente al aumentar la tem-

**Tabla I**  
**Efecto de la temperatura en la técnica de cromatografía por afinidad en columna**

Muestra	Fracción de masa		
	18 °C	25 °C	30 °C
1	0,060	0,059	0,061
2	0,058	0,057	0,059
3	0,057	0,062	0,056
4	0,066	0,067	0,066
5	0,162	0,163	0,165
6	0,117	0,115	0,115
7	0,168	0,169	0,168
8	0,140	0,139	0,140

peratura en el intervalo de 18° a 28° C, motivo por el que algunos fabricantes de reactivos adjuntan un nomograma para la corrección de valores obtenidos a distintas temperaturas. Es por ello que resulta inexplicable que los autores encuentren valores *más bajos* a 23° C que a 21° C y a 27° C que a 25° C. La correcta termostatación de las columnas durante el proceso de elución puede resultar complicada cuando se trabaja entre márgenes tan estrechos de temperatura, lo que podría explicar estos resultados anómalos. Por otra parte, es incorrecto afirmar que la cromatografía de intercambio iónico requiere control de la temperatura ya que en la actualidad se comercializan reactivos y columnas que utilizan este procedimiento para la determinación de hemoglobina A<sub>1c</sub> y que son independientes de la temperatura (BioSystems, cod 11044 y 11045).

Con referencia al efecto de la temperatura sobre la cromatografía de afinidad, los resultados obtenidos en nuestro laboratorio difieren de los mostrados por Rosel y col. (1). La Tabla I muestra los resultados obtenidos en 8 muestras distintas, con diversos valores de glicohemoglobina, y ensayadas a tres temperaturas, pudiéndose comprobar que la temperatura no afectaba los valores obtenidos.

Cabe hacer una última observación a la Tabla V del trabajo aludido, donde los tiempos requeridos para las determinaciones cromatográficas parecen francamente exagerados. La determinación de glicohemoglobina mediante cromatografía de intercambio iónico no debe tomar más de 1 hora (1 hora y media si se eluye la fracción A<sub>0</sub>). Empleando la cromatografía de afinidad, la determinación ocupa unos 40-60 minutos.

#### Bibliografía

1. Rosel P, Huguet J, Rivera A, Guillén E, Arranz B., Navarro M.A. Glicohemoglobina: estudio del efecto de la temperatura y de la fracción lábil en diferentes métodos cromatográficos. *Quim Clin* 1990; 9: 407-10.
2. Huisman W, Kuijken JPAA, Tan Tjong HL, Duurkoop EP, Leijse B. Unstable glycosylated hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 1982; 118: 303-7.
3. Nathan DM. Labile glycosylated hemoglobin contributes to hemoglobin A<sub>1c</sub> as measured by liquid chromatography or electrophoresis. *Clin Chem* 1981; 27: 1261-67.
4. García G, Elduque A, Gimferrer E, Baiget M. La hemoglobina glucosilada lábil: Importancia de su eliminación en el ensayo cromatográfico de las hemoglobinas glucosiladas. *Biol Clin Hematol* 1982; 4: 189-96.
5. Klenk DC, Hermanson GT, Krohn RI, Fujimoto EK, Mallia AK, Smith PK, England JD, Wiedmeyer HM, Little RR, Goldstein DE. Determination of glycosylated hemoglobin by affinity chromatography: Comparison with colorimetric and ion-exchange methods, and effects of common interferences. *Clin Chem* 1982; 28: 2088-94.
6. Ceriello A, Paolisso G, Dello Russo P, Giugliano D, Sgambato S. Influence of labile glucose adducts on glycosylated protein assay by aminophenylboronic acid affinity chromatography: In vivo studies. *Acta Diabetologia Latina* 1985; 22: 81-82.
7. Oremek G, Seiffert UB, Schmid G. Determination of glycosylated hemoglobin by affinity chromatography. *Clin Chim Acta* 1987; 168: 81-86.
8. Fluckiger R. Glycosylated hemoglobins. *J Chromatography* 1988; 429: 279-92.

## Réplica

P. Rosel, J. Huguet, A. Rivera, E. Guillén,  
B. Arranz, M.A. Navarro

Sección de Hormonas. Servicio de Bioquímica Clínica.  
Hospital Princeps d'Espanya. Barcelona

En respuesta a la carta de F.J. Gella, L. Taberner y G. García sobre un trabajo recientemente publicado por nuestro grupo en esta revista (1) efectuamos las siguientes apreciaciones:

Con respecto al primer punto de su carta referente a la eliminación de la fracción lábil, consideramos que la eliminación de dicha fracción es imprescindible tanto para las columnas de afinidad como en la cromatografía de intercambio iónico, tal como se demuestra en nuestro estudio. En nuestro trabajo se efectuó la eliminación de dicha fracción por el mismo procedimiento en *todos* los métodos.

La incomprendibilidad de los datos de la Tabla I a la que hacen referencia los autores de la carta se debe probablemente a un fallo de imprenta. Los valores correctos de desviación estándar son 0,024 y 0,023 respectivamente.

Está ampliamente demostrada (2) la obtención de valores de glicohemoglobina falsamente aumentados o disminuidos cuando se produce respectivamente un aumento o disminución de la temperatura durante el proceso de elución. Estos dos hechos se producen principalmente cuando se trabaja con minicolumnas de intercambio iónico. Los resultados que aparecen en la Tabla IV de nuestro estudio han sido previamente corregidos a 23° C con el nomograma suministrado por BioSystem S.A. para la corrección de los resultados. Tal como reflejan los datos publicados en nuestro estudio, dicho nomograma es de dudosa utilidad para temperaturas que no se encuentren dentro del intervalo de 23-24° C.

Por otra parte, si bien es cierto que BioSystems S.A. posee un equipo para la determinación de la hemoglobina A<sub>1c</sub> mediante cromatografía de intercambio iónico que, aunque no totalmente independiente de la temperatura, presenta unos intervalos de la misma más factibles para la rutina del laboratorio, en nuestro trabajo nos referimos en todo momento a la hemoglobina A<sub>1A+B+C</sub>.

En lo que respecta al estudio de la influencia de la temperatura sobre la cromatografía de afinidad efectuado en nuestro trabajo, además de utilizar un mayor número de casos (18 frente a 8), los intervalos de temperatura estudiados son considerablemente más amplios (7-30° C frente a 28-30° C) que los estudiados por Gella, Taberner y García, obteniendo diferencias estadísticamente significativas cuando la temperatura no se encuentra dentro del intervalo de 16-25° C.

Por último, consideramos que los tiempos por determinación presentados en la Tabla V no son en absoluto exagerados si en ellos se incluyen todos y cada uno de los pasos realizados previa y posteriormente a la elución de la columna.

#### **Bibliografía**

1. Rosel P, Huguet J, Rivera A, Guillén E, Arranz B, Navarro M.A. Glicohemoglobina: estudio del efecto de la temperatura y de la fracción lábil en diferentes métodos cromatográficos. *Quim Clin* 1990; 9: 407-410.
2. Fernández I, Rodríguez MA, Rivas M, Griera JL, Durán S. Determinación de los niveles de hemoglobinas glucosiladas: aspectos metodológicos. *Med Clin* 1983; 81: 143-146.