COLINESTERASE

MÉTODO
Cinético-Colorimétrico.

FINALIDADE
Reagentes para a determinação da atividade enzimática da colinesterase (pseudocolinesterase ou colinesterase II) em amostras de soro ou plasma por espectrofotometria colorimétrica. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

FUNDAMENTO
A colinesterase (CHE) catalisa a hidrólise do substrato de butiriltiocolina liberando tiocolina e butirato. A atividade catalítica da colinesterase (CHE) na amostra analisada é diretamente proporcional ao decréscimo da absorbância medida em 405 nm quando o ferricianeto (amarelo) é reduzido para ferrocianeto (incolor) pela ação da tiocolina.

$$\text{Butirilcolina} + H_2O \xrightarrow{CHE} \text{Tiocolina} + \text{Butirato}$$

$$\text{Tiocolina} + \text{Ferricianeto} + 2OH^- \longrightarrow \text{Colina} + H_2O + \text{Ferrocianeto}$$

SIGNIFICADO CLÍNICO
A colinesterase é uma enzima com a função de catalisar a hidrólise da acetilcolina e outras colinas, regulando a transmissão do impulso nervoso na sinapse do nervo e na junção neuromuscular. Dois tipos de colinesterase são determinados: acetilcolinesterase (colinesterase verdadeira) e pseudocolinesterase. Enquanto a acetilcolinesterase (acetil colina hidrolase) é encontrada nas hemácias e terminações de nervos colinérgicos, a pseudocolinesterase (butirilcolinesterase) encontra-se no plasma, fígado, músculo liso e adipócitos. A colinesterase sérica é também denominada de pseudocolinesterase e a sua dosagem é de grande valor para o diagnóstico de pacientes com a forma atípica da enzima e em intoxicações por inseticidas organofosforados.
Valores diminuídos: São encontrados nas seguintes situações: no envenenamento por inseticidas organofosforados, doença hepatocelular, desnutrição, infecções agudas, embolismo pulmonar, distrofia muscular e infarto do miocárdio.

IDENTIFICAÇÃO E ARMAZENAMENTO:
Conservar entre 2 e 8°C.

BUF – Tampão: Contém tampão pirofosfato 90 mmol/L e ferricianeto de potássio ≥ 2 mmol/L.

SUB – Substrato: Contém butiriltiocolina ≥ 15 mmol/L.

ESTABILIDADE
Os reagentes são estáveis até o vencimento da data de validade impressa no rótulo do produto e na caixa quando conservados na temperatura recomendada, bem vedados e se evite a contaminação durante o uso.

TRANSPORTE:
O transporte deve ser realizado em temperaturas entre 2 e 8°C, conforme condições de conservação do produto.

TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA:
O fabricante garante a qualidade do produto, se este for armazenado como descrito acima e em sua embalagem original

PRECAUÇÕES:
- Aplicar os cuidados habituais de segurança na manipulação dos reagentes e amostra biológica.
- Recomendamos o uso das Boas Práticas de Laboratórios Clínicos para a execução do teste.
- De acordo com as instruções de biossegurança, todas as amostras devem ser manuseadas como materiais potencialmente infectantes.
- Descartar os reagentes e as amostras de acordo com as resoluções normativas locais, estaduais e federais de preservação do meio ambiente.
- Os riscos residuais do kit, de acordo com critérios pré-determinados, são aceitáveis em comparação aos benefícios proporcionados pelo uso. A análise de risco foi realizada de acordo com a ISO 14971, relacionada à data final e levando em consideração a atual informação de registro.

MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS:
- Fotômetro UV/VIS
- Banho-Maria temperatura constante (37°C)
- Pipetas
- Cronômetro

AMOSTRA BIOLÓGICA:
SORO, PLASMA (heparina ou EDTA).
Não usar amostras hemolisadas e nem com sinais de contaminação bacteriana. Não utilizar anticoagulantes que contém fluoreto pois há inibição da atividade da colinesterase neste caso. A colinesterase no soro ou plasma é estável por 15 dias entre 2-8 ºC.

Nota:
Recomendamos que a coleta, preparação, armazenamento e descarte das amostras biológicas sejam realizadas seguindo as recomendações das Boas Práticas de Laboratórios Clínicos. Enfatizamos que os erros provenientes da amostra podem ser muito maiores do que os erros ocorridos durante o procedimento analítico.

PROCEDIMENTO DO TESTE
A. Condições de Reação
- Leitura: Comprimento de onda 405 nm
- Temperatura: 37°C
- Tipo de reação: Cinética contínua decrescente

B. Técnica de Análise
1. Pipetar em uma cubeta ou tubo:
1000 µL de Tampão (1) + 20 µL de amostra.
2. Misturar e incubar por 3 minutos a 37ºC.
3. Adicionar 250 µL do Substrato (2), homogeneizar e transferir imediatamente para a cubeta termostatizada a 37ºC.
4. Inserir a cubeta no porta-cubetas termostatizado (37ºC) e acionar o cronômetro.
5. Após 2 minutos, fazer a leitura da absorbância inicial em 405 nm (A0).
6. Fazer novas leituras de absorbância em 405 nm após exatamente 1, 2 e 3 minutos (A1, A2 e A3).
7. As diferenças entre as absorbâncias devem ser praticamente iguais, indicando a linearidade do método.

Cálculos através do Fator Teórico
Calcular o decréscimo médio de absorbância por minuto (ΔA/minuto médio) e usar este valor para o cálculo da atividade da Colinesterase na amostra.
U/L de Colinesterase (CHE) em 405 nm = ΔA/minuto médio x 74400
Onde: ΔA/min = Variação média da absorbância por minuto
O fator 74400 é calculado com base nas condições da reação cinética contínua.
Esse fator deve ser recalculado sempre que se fizer qualquer modificação nos parâmetros da reação. Ver método para cálculo do fator.

Exemplo
Se ΔA/minuto médio do teste = 0,129
Atividade CHE em U/L= ΔA teste X 74400
Atividade CHE = 0,129 X 74400 = 9597 U/L

Cálculo do Fator

$$\text{Fator} = \frac{Vt \times 1000}{\varepsilon \times Va \times d}$$

Vt = volume total do ensaio = 1270 µL
Va = volume da amostra = 20 µL
1000 = conversão de U/mL para U/L
d = espessura da cubeta, via da luz = 1 cm
ε = Coeficiente de absortividade milimolar do cromógeno em 405 nm e na via de luz de 1 cm = 0,853

$$\text{Fator} = \frac{1270 \times 1000}{0.853 \times 20 \times 1} = 74400$$

Fator = 74400

C. Técnica de Análise com calibrador STD
Notas
1. Utilizar o calibrador STD Cat. xxxx não incluso no kit.
Ver Instruções de Uso e valor tabelado para Colinesterase.
2. O desempenho do Calibrador pode ser afetado por vários fatores como: erros de reconstituição, de homogeneização, armazenamento incorreto, contaminação da água ou vidraria.

Dosagem do Calibrador e do Teste
1. Calibrador: Seguir o mesmo procedimento da Técnica de Análise sem Calibrador (Item B) substituindo 20 µL da amostra por 20 µL do calibrador STD.
2. Teste: Seguir o mesmo procedimento da Técnica de Análise sem Calibrador (Item B).

Cálculos através do Fator de Calibração Experimental
Calcular o decréscimo médio de absorbância por minuto (ΔA/minuto médio) do Teste e do Calibrador e usar os valores para o cálculo da atividade da Colinesterase na amostra.

Ver Linearidade.
ΔA/minuto médio = Variação média da absorbância por minuto.
AC = Atividade de CHE do Calibrador = (Verificar o valor de CHE na tabela do Calibrador)
AT = Atividade de CHE do Teste em U/L = ΔA/minuto do Teste x FC
FC = Fator de Calibração = AC ÷ ΔA/minuto médio do Calibrador

Exemplo
Se ΔA/minuto médio do Calibrador = 0,055
Se ΔA/minuto médio do Teste = 0,044
Se AC = 3670 U/L (Valor de CHE na tabela do Calibrador)
FC = AC ÷ ΔA/minuto médio do Calibrador = 3670 ÷ 0,055 = 66727
AT = Atividade de CHE do Teste em U/L = ΔA/minuto médio do Teste x FC
AT = Atividade de CHE do Teste em U/L = 0,044 x 66727 = 2936 U/L

Conversão de Unidades
Unidade Convencional (U/L) x 0,0167 = Unidade SI (Kat/L)

VALOR DE REFERÊNCIA:
Homens: 4620 - 11500 U/L
Mulheres: 3930 - 10800 U/L

Estes valores devem ser usados como uma orientação. É recomendado que cada laboratório estabeleça seus próprios valores de referência.

AUTOMAÇÃO:
Adaptação especial para analisadores pode ser fornecida quando solicitada.

CALIBRAÇÃO:
Recomendamos a verificação da validade da calibração antes de cada corrida.
A recalibração deve ser realizada quinzenalmente ou:
- Sempre que os controles se encontrarem fora da faixa;

- Depois da troca de lote de reagente;
- De acordo com o requerido no controle de qualidade interno.

CONTROLE DE QUALIDADE:
Todo soro controle contendo valores determinados para o método cinético-colorimétrico para a colinesterase pode ser empregado.

CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO
Interferências
Concentrações de bilirrubina até 20 mg/dL, hemoglobina até 200 mg/dL e triglicérides até 1200 mg/dL não produzem interferências significativas.

Linearidade
A reação é linear até 20000 U/L. Para valores acima da faixa linear, diluir a amostra com solução de NaCl 150 mmol/L (0,85%).
Fazer nova determinação e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição empregado.

Repetitividade
A imprecisão intra-ensaio foi calculada com 20 determinações, utilizando três amostras com valores de 2881 U/L, 8080 U/L e 13925 U/L.
As médias dos coeficientes de variação obtidas foram de 0,59, 0,35 e 0,36% respectivamente.

Reprodutibilidade
A imprecisão inter-ensaio foi calculada com 20 determinações, utilizando três amostras com valores de 2881 U/L, 8080 U/L e 13925 U/L.
As médias dos coeficientes de variação obtidas foram de 1,16, 0,92 e 1,08% respectivamente.

OBSERVAÇÕES
1. A observação minuciosa da limpeza e secagem da vidraria, da estabilidade dos reagentes, da pipetagem, da temperatura e do tempo de reação é de extrema importância para se obter resultados precisos e exatos.
2. Na limpeza da vidraria pode-se empregar um detergente neutro ou uma solução ácida. A última lavagem deve ser feita com água destilada ou deionizada.
3. A água utilizada nos laboratórios clínicos deve ser purificada utilizando-se métodos adequados para as finalidades de uso. Colunas deionizadoras saturadas liberam diversos íons, aminas e agentes oxidantes que deterioram os reativos.

APRESENTAÇÃO DO KIT:

Nº CAT	REAGENTE	VOLUME	Nº TESTES
06430-1	BUF SUB	1 x 24 mL 1 x 6 mL	24

BIBLIOGRAFIA:

1. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Fundamento de Química Clínica, 4ª Ed – Guanabara Koogan SA; 1998.
2. Lopes HJJ. Enzimas no Laboratório Clínico - Aplicações Diagnósticas. Belo Horizonte - Analisa Diagnóstica, 2000.
3. Mota VT. Bioquímica Clínica: Métodos e Interpretações. Porto Alegre, Ed. Médica Missau. 1999: 147-152.
4. Okabe H. et al. New enzymatic assay of cholinesterase activity. Clin Chim Acta 80: 87-94, 1977.
5. Panteghini M and Bonora R. Evaluation of a new continuous colorimetric method for determination of serum pseudo-cholinesterase catalytic activity and its application to a centrifugal fast analyser. J Clin Chem Biochem 22: 671-676, 1984.
6. Whittaker M et al. Comparison of a commercially available assay system with two reference methods for the determination of plasma cholinesterase variants. Clin Chem 29: 1746-1751, 1983.
7. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratry tests, 3th ed. AACC Press, 1997.

DEPARTAMENTO DE SERVIÇOS ASSOCIADOS:
Para esclarecimentos de dúvidas do consumidor quanto ao produto.
Telefone: **31-3654-6366** E-mail: invitroms@invitro.com.br

Produzido e Distribuído por In Vitro Diagnóstica Ltda
Rua Cromita, 278, Distrito Industrial – Itabira/MG. CEP: 35903-053
Telefone: 31-3067-6400 e-mail: invitroms@invitro.com.br
Resp. Téc.: Patrícia C. C. Vilela – CRF 4463
Reg. M.S. 10303460549 Classe de Risco: II

SIGNIFICADO DOS SÍMBOLOS UTILIZADOS NOS RÓTULOS DO PRODUTO

	Data limite de utilização
	Limite de temperatura (conservar a 2 – 8°C)
REF	Número do Catálogo
	Consultar Instrução de Uso
LOT	Número do lote
IVD	Produto Diagnóstico In Vitro
	Data de Fabricação