Colinesterase - SNIBE

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* profissional.

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.

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

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

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: Tampão pirofosfato 90 mmol/L e ferricianeto de potássio ≥2 mmol/L.

SUB – Substrato: Butiriltiocolina ≥ 15 mmol/L.

PREPARO DO REAGENTE DE USO
Os reagentes estão prontos para uso.

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 do kit deve ser feito pela rota mais direta evitando-se as chegadas nos finais de semana e feriados no local de destino. O kit não é afetado pelo transporte desde que seja entregue ao destinatário no período máximo de 7 dias e em uma temperatura de até 37ºC.

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
• Somente para uso diagnóstico *in vitro* profissional.
• Recomendamos o uso das Boas Práticas em Laboratório Clínico para a execução do teste.
• Seguir com rigor a metodologia proposta para obtenção de resultados exatos.
• De acordo com as instruções de biossegurança, todas as amostras devem ser manuseadas como materiais potencialmente infectantes.
• 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.

AMOSTRA BIOLÓGICA
Tipo de amostra: 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.

Estabilidade das amostras: A colinesterase no soro ou plasma é estável por 15 dias entre 2-8 ºC.

• 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.
• O transporte da amostra biológica, quando necessário, deve ser feito pela rota mais direta e evitando sua chegada nos finais de semana e feriados no local de destino. A amostra biológica deve ser acondicionada em recipiente hermeticamente fechado, em seguida embalada de forma a mantê-la em temperatura recomendada (2 a 8ºC) desde o remetente até a entrega ao destinatário. Esta amostra deve ser identificada com o símbolo de amostra biológica.

MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS
Equipamento de bioquímica automático, pipeta, ponteira e lixo para descarte. Os materiais não fornecidos podem ser adquiridos no mercado especializado de artigos para Laboratórios de Análises Clínicas.

MÉTODO DE ANÁLISE

A. Leitura em espectrofotômetro:
Comprimento de onda 405 nm
Temperatura: 37ºC
Tipo de reação: Cinética contínua decrescente

B. Procedimento de teste:

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

Técnica de Análise com um calibrador STD
Notas
1. Utilizar um calibrador STD 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)

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.

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.

CONTROLE DE QUALIDADE
Todo soro controle contendo valores determinados para o método cinético-colorimétrico para a colinesterase pode ser empregado. Recomendamos a utilização de nossos soros controle da linha Multicontrole de Bioquímica - Snibe.

AUTOMAÇÃO
Adaptação especial para analisadores automáticos de bioquímica está disponível e será enviada ao consumidor quando solicitada para o Departamento de Serviços Associados.

CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

Exatidão
O método proposto foi comparado com outro produto de metodologia semelhante, sendo obtido os seguintes resultados:

	Método comparativo	Método In Vitro
Nº de amostras	40	40
Intervalo de concentrações	1335 – 10356	1344 – 10297
Equação da Regressão	Método In Vitro = (0,9978 x Método comparativo) – 23,8	
Coeficiente de Correlação	0,999	

Utilizando a equação da regressão, o erro sistemático (bias) estimado é igual a 1,01% para uma amostra com atividade de colinesterase igual a 3000 U/L, 0,52% para uma amostra com atividade de colinesterase igual a 8000 U/L e 0,39% para uma amostra com atividade de colinesterase igual a 14000 U/L. Esses erros são menores que o erro sistemático analítico da especificação desejável baseada na variação biológica que é ≤± 4,8%.

Precisão
Repetibilidade
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.

Sensibilidade
Sensibilidade = Média das concentrações + 2.s
S = -0,1 + (2 x 25,77) → S = 51,44 U/L

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.

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

APRESENTAÇÃO DO KIT

Cat. N°	Reagenre	Volume
809-1	BUF SUB	1 x 24 mL 1 x 6 mL

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: +55(31) 3067-6400 e-mail: invitroms@invitro.com.br

Fabricado e Regularizado por: In Vitro Diagnóstica Ltda. Rua Cromita, 278, Distrito Industrial, Itabira/MG. CEP: 35903-053. CNPJ: 42.837.716/0001-98.
Telefone: +55(31) 3067-6400 e-mail: invitroms@invitro.com.br
Resp. Téc.: Patrícia C. C. Vilela – CRF 4463

ANVISA: 10303460600 Classe de Risco: II

SIGNIFICADO DOS SÍMBOLOS UTILIZADOS NOS RÓTULOS DO PRODUTO


Data limite de utilização


Limite de temperatura (conservar a 2 – 8°C)



Número do Catálogo


Consultar Instrução de Uso



Número do lote



Produto Diagnóstico In Vitro


Data de Fabricação