

**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.

**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 determinadas: 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.

QUALIFICAÇÕES DO PRODUTO

- Metodologia cinética contínua colorimétrica, simples e rápida para a determinação da colinesterase, facilmente adaptável em analisadores automáticos e semi-automáticos.
- A metodologia permite obter resultados exatos e precisos se for executada conforme descrita nesta Instrução de Uso.

IDENTIFICAÇÃO DOS REAGENTES

Conservar entre 2-8 °C.

1- Tampão - Contém tampão pirofosfato 95 mmol/L e ferricianeto de potássio 2,5 mmol/L.

2- Substrato - Contém butiriltiocolina 60 mmol/L.

ESTABILIDADE

Os reativos 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.

MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS

- Espectrofotômetro com cubeta termostatizada a 37 °C;
- Tubos e pipetas;
- Cronômetro;
- Banho-Maria ou termostatizador.

PRECAUÇÕES E CUIDADOS ESPECIAIS

- 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.

INTERFERÊNCIAS

A bilirrubina até 45 mg/dL, lipemia (triglicérides até 1400 mg/dL), hemólise (hemoglobina até 1000 mg/dL) e ácido ascórbico até 30 mg/dL não produzem interferências significativas.

AMOSTRA

SORO, PLASMA (heparina ou EDTA).

Não usar amostras hemolisadas e nem com sinais de contaminação bacteriana.

A colinesterase no soro ou plasma é estável por 15 dias entre 2-8 °C.

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 sem Calibrador

1- Pipetar em uma cubeta ou tubo:

1000 µL de Tampão (1) + 20 µL de amostra.

2- Misturar e incubar por 3 minutos a 37 °C.

3- Adicionar 250 µL do Substrato (2), homogeneizar e transferir imediatamente para a cubeta termostatizada a 37 °C.

4- Inserir a cubeta no porta-cubetas termostatizado (37 °C) e acionar o cronômetro.

5- Após 2 minutos, fazer a leitura da absorbância inicial em 405 nm (A_0).

6- Fazer novas leituras de absorbância em 405 nm após exatamente 1, 2 e 3 minutos (A_1 , A_2 e A_3).

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 ($\Delta A/\text{minuto}$ médio) e usar este valor para o cálculo da atividade da Colinesterase na amostra.

U/L de Colinesterase (CHE) em 405 nm = $\Delta A/\text{minuto}$ médio x 68500

Onde: $\Delta A/\text{min}$ = Variação média da absorbância por minuto

O fator 68500 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 $\Delta A/\text{minuto}$ médio do teste = 0,129

Atividade CHE em U/L = ΔA teste X 68500

Atividade CHE = 0,129 X 68500 = 8836 U/L

Cálculo do Fator

$$\text{Fator} = \frac{V_t \times 1000}{\epsilon \times V_a \times d}$$

V_t = volume total do ensaio = 1270 µL

V_a = 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 absorvidade milimolar do cromógeno em 405 nm e na via de luz de 1 cm = 0,927

$$\text{Fator} = \frac{1270 \times 1000}{0,927 \times 20 \times 1} = 68500$$

Fator = 68500

C- Técnica de Análise com Calibrador Cat. 410 da Gold Analisa**Notas**

1- Utilizar o Calibrador Cat. 410 da Gold Analisa.

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 Cat. 410 da Gold Analisa.

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 absorvância por minuto ($\Delta A/\text{minuto}$ médio) do Teste e do Calibrador e usar os valores para o cálculo da atividade da Colinesterase na amostra.

Ver Linearidade.

$\Delta A/\text{minuto}$ médio = Variação média da absorvância por minuto.

AC = Atividade de CHE do Calibrador = $x \text{ U/L}$ (Ver valor de CHE no rótulo do frasco de Calibrador)

AT = Atividade de CHE do Teste em $\text{U/L} = \Delta A/\text{minuto}$ do Teste x FC

FC = Fator de Calibração = $AC \div \Delta A/\text{minuto}$ médio do Calibrador

Exemplo

Se $\Delta A/\text{minuto}$ médio do Calibrador = 0,055

Se $\Delta A/\text{minuto}$ médio do Teste = 0,044

Se AC = 3670 U/L (Valor de CHE no rótulo do frasco de Calibrador)

FC = $AC \div \Delta A/\text{minuto}$ médio do Calibrador = $3670 \div 0,055 = 66727$

AT = Atividade de CHE do Teste em $\text{U/L} = \Delta A/\text{minuto}$ médio do Teste x FC

AT = Atividade de CHE do Teste em $\text{U/L} = 0,044 \times 66727 = 2936 \text{ U/L}$

Conversão de Unidades

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

VALORES 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

Este kit pode ser utilizado na maioria dos analisadores automáticos.

O consumidor poderá solicitar mais informações através do Setor de Apoio ao Cliente (SAC) ou acessando o site www.goldanalisa.com.br.

CONTROLE DA QUALIDADE

O laboratório clínico deve manter um Programa de Garantia da Qualidade para assegurar que todos os procedimentos laboratoriais sejam realizados de acordo com as Boas Práticas de Laboratórios Clínicos.

Para controle e verificação do desempenho do kit podem ser utilizadas amostras controle com valores estabelecidos pelos fabricantes.

É importante que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores médios e os respectivos limites de variação.

CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO⁸

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 duas amostras com valores de 5416 U/L e 11279 U/L.

As médias dos coeficientes de variação obtidas foram de 1,0 e 0,7%.

Reprodutibilidade

A imprecisão inter-ensaio foi calculada com 25 determinações, utilizando duas amostras com valores de 5416 U/L e 11279 U/L.

As médias dos coeficientes de variação obtidas foram de 1,0 e 0,6%.

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, amins e agentes oxidantes que deterioram os reativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 laboratory tests, 3ª ed. AACCPress, 1997.

8. GOLD ANALISA: Informe Técnico do Produto.

APRESENTAÇÃO

| Cat. | Embalagem | Reagentes | Volume |
|------|-----------|---------------------|-----------------------|
| 415M | Mini | Tampão Substrato | 1 x 24 mL 1 x 6 mL |
| 415 | Normal | Tampão Substrato | 2 x 24 mL 2 x 6 mL |

TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

Lei nº 8.078 de 11-9-90 - Código de Defesa do Consumidor

A Gold Analisa garante a substituição, sem ônus para o consumidor, de todos os produtos que comprovadamente apresentarem problemas técnicos, desde que o usuário utilize equipamentos e materiais em boas condições técnicas, siga rigorosamente o procedimento técnico e as recomendações estabelecidas nas Instruções de Uso.

Nº do lote e data de validade: Vide rótulos do produto

Gold Analisa Diagnóstica Ltda - CNPJ: 03.142.794/0001-16

AF MS Nº 800222-3 - Reg. MS - Nº 80022230118

Farm. Resp. Ludmilla Parreiras Campos - CRF- MG -25481

Av. Nossa Senhora de Fátima, 2363 - Carlos Prates - Fone: (31) 3272-1888

Belo Horizonte MG Brasil CEP: 30710-020

Home page: www.goldanalisa.com.br

E-mail: goldanalisa@goldanalisa.com.br

Setor de Apoio ao Cliente (SAC): 0800 703 1888

Analisa é marca registrada da Gold Analisa Diagnóstica Ltda