



TECO GRAM S.A.
Av. San Jorge 428 y 10ma.
Guayaquil - Ecuador
042396966 – 042397979 – 042396610
tecogram@gye.satnet.net

REACTIVO DE COLINESTERASA (METODO CINÉTICO)

USO RECOMENDADO

El reactivo de colinesterasa es usado para el diagnóstico in Vitro en la determinación cuantitativa cinética de la colinesterasa en suero humano, plasma o sangre entera.

INTRODUCCION

La medición de la colinesterasa en suero ha sido usada para evaluar la función del hígado y monitorear la exposición excesiva a insecticidas de fósforo orgánico. También es útil para predecir la susceptibilidad ante apneas prolongadas después de la administración de succinilcolina y para investigar transmisión genética de las variantes de la enzima colinesterasa. Existen muchos métodos para medir la actividad de la colinesterasa, estos incluyen procedimientos manométricos, titrimétricos, y fotométricos. El procedimiento colorimétrico basado en la reacción de Ellman es sensible y simple. Por lo tanto, esta técnica forma la base de nuestro reactivo.

PRINCIPIO

Las reacciones producidas en el ensayo de colinesterasa son las siguientes:

CHOE

Propionitiocoline + H₂O ----- > Acido propionico + Thiocolina

Thiocolina + DTNB ----- > 5-Thio-2-nitrobenzoato.

La Colinesterasa hidroliza el Propionitiocoline (PTC) hasta formar Thiocoline, el cual reacciona con 5,5'-dithiobis-2-acido nitrobenzoico (DTNB) que conducen a un 5-thio-2-nitrobenzoato amarillo con una absorbancia máxima a 405 nm. Por lo tanto, el porcentaje del cambio en la absorbancia a 405 nm es directamente proporcional a la actividad de la colinesterasa.

COMPOSICION DEL REACTIVO

El reactivo de Colinesterasa (PTC), cuando se reconstituye de acuerdo a las indicaciones, tiene los siguientes ingredientes activos. La concentración aproximada de cada componente es la siguiente:

Propionithiocolone 4 mM, DTNB 0.4 mM, Buffer y estabilizadores no reactivos y rellenos.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

El Reactivo de Colinesterasa (PTC) es solo para uso diagnóstico in Vitro. Se deben utilizar las normales precauciones en la manipulación de reactivos de laboratorio.

ALMACENAMIENTO DEL REACTIVO Y ESTABILIDAD

Guarde el reactivo seco bajo refrigeración (2 – 8°C). El Reactivo es estable hasta la fecha de expiración que muestra la etiqueta. El reactivo reconstituido es estable hasta por 6 horas a temperatura ambiente (15 – 30°C) y hasta por 3 días bajo refrigeración (2 – 8°C).

PREPARACION DEL REACTIVO

ACTIVIDAD TOTAL DE LA COLINESTERASA:

Reconstituya el Reactivo de Colinesterasa (PTC) con el volumen total de agua desionizada que indica la etiqueta del frasco. Después de agregar el agua, tape el frasco e inmediatamente mezcle varias veces por inversión.

INHIBIDOR DE DIBUCAINA:

Reconstituya un frasco de reactivo de colinesterasa (PTC) con solución de dibucaina, en lugar de usar agua desionizada.

INHIBIDOR DE FLUORURO:

Reconstituya un frasco de reactivo de colinesterasa (PTC) con solución de fluoruro, en lugar de agua desionizada

DETERIORO DEL REACTIVO

El reactivo debe ser desechado si:

1. Ha penetrado humedad en el frasco y ha ocurrido endurecimiento.
2. El reactivo reconstituido no tiene una absorbancia contra agua mayor que 1.2 a 405 nm.

RECOLECCION DE MUESTRA Y ALMACENAMIENTO

La actividad de la colinesterasa es estable en el suero no diluido hasta por dos semanas a una temperatura de 2 – 8°C y hasta por 3 meses a -20°C. Se debe retirar el suero del coágulo rápidamente. El EDTA no inhibe la actividad de la colinesterasa.

La preparación del reactivo para la medición de la actividad de la colinesterasa en sangre entera es la siguiente. Ponga la sangre en tubos que contienen EDTA como anticoagulante. Mezcle bien la sangre entera. Se debe retirar una parte de sangre para la determinación del hematocrito. Prepare el hemolizado de sangre mezclando 0.1 ml de sangre con 1.9 ml de agua destilada. Mezcle hasta que se complete la hemólisis. Centrifugue la sangre restante para obtener un plasma claro. Determine las actividades de la colinesterasa en el plasma y hemolizado siguiendo las instrucciones en la sección del "Procedimiento". Almacene el hemolizado a una temperatura de 2 – 8°C y determine las actividades de la enzima en estas muestras dentro de ocho horas.

SUSTANCIAS QUE INTERFIEREN

Las muestras de suero hemolizado no deben ser usadas. Se conoce que ciertas drogas y otras sustancias pueden afectar a la actividad de la colinesterasa.

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

1. Espectrofotómetro, con compartimento de temperatura controlada, capaz de medir con precisión la absorbancia a 405 nm.
2. Tubos de ensayo con propiedades ópticas adecuadas para usar a 405 nm.
3. Pipetas con niveles de precisión requeridos para el ensayo.
4. Cronómetro.
5. Soluciones de dibucaina y fluoruro de sodio.

PROCEDIMIENTO AUTOMATIZADO

Refiérase al manual de aplicación apropiado y disponible.

PROCEDIMIENTO MANUAL

1. Reconstituya el reactivo de acuerdo a las instrucciones.
2. Pipetee 1.0 mL de reactivo a los tubos apropiados y deje que se equilibren a 30°C o 37°C.
3. Ponga en cero el espectrofotómetro con agua a 405 nm.
4. Añada 10 µl de muestra (suero, plasma o hemolizado). Mezcle bien.
5. Después de 15 segundos, mida la absorbancia (A₁). Regrese el tubo a los 30°C o 37°C por otros 30 segundos y mida otra absorbancia (A₂).
6. Calcule la ΔA por 30 segundos restando A₁ de A₂. Multiplique por 2 para obtener la ΔA por minuto.
7. Calcule la actividad de la colinesterasa (U/L) de la muestra multiplicando ΔA/min por 7426.

VOLUMENES ALTERNATIVOS

La actividad de la colinesterasa también puede ser determinada usando 10 µl de muestra y 3 mL de reactivo. Se deben usar diferentes factores de calibración si la muestra y los volúmenes de los reactivos son diferentes de los volúmenes requeridos en los procedimientos.

ENSAYOS DE DIBUCAINA E INHIBICION DEL FLUORURO

Siguiendo los mismos pasos del procedimiento, determine la actividad de la colinesterasa en las muestras usando reactivos que contienen Dibucaina y Fluoruro preparados de acuerdo a las instrucciones que se han dado en la Preparación del Reactivo. Para determinar el porcentaje de inhibición de la actividad, refiérase a Cálculos.

CÁLCULOS (CINÉTICO)

$$\text{Actividad de la Colinesterasa (U/L)} = \frac{\Delta A/\text{min} \times TV \times 1000}{13.6 \times LP \times SV}$$

ΔA/min = Cambio de absorbancia por minuto
TV = Volumen Total (1.01 mL)
SV = Volumen de la muestra (0.01 mL)
13.6 = Absorbancia milimolar de DTNB
LP = Paso de la luz (1 cm).
1000 = Conversión de unidades por mL a unidades por Litro.

$$\text{Actividad de la Colinesterasa (U/L)} = \frac{\Delta A/\text{min} \times TV \times 1000}{13.6 \times 1.0 \times 0.01}$$

NOTA: En la preparación del hemolisato intervienen una dilución por 20 de la muestra. Por lo tanto, la Actividad de la Colinesterasa en el hemolisato calculado por la fórmula ya descrita debe ser multiplicada por 20 para compensar la dilución.

Ejemplo: A₁ = 0.316 A₂ = 0.491
A₂ - A₁ = 0.491 - 0.316 = 0.175
ΔA/min = ΔA/30 segundos x 2 = 0.350

La actividad de la colinesterasa (U/L) de la muestra = 0.350 x 7426 = 2599.

INHIBICION DE LA DIBUCAINA Y EL FLUORURO

Calcule el porcentaje de la inhibición de la Actividad de la Colinesterasa (U/L) de la siguiente forma:

$$\text{Inhibición de la Dibucaina y Actividad de la Colinesterasa (\%)} = 100 - \frac{(\text{CHE} - \text{D})}{\text{CHE}} \times 100$$

$$\text{Inhibición del Fluoruro y Actividad de la Colinesterasa (\%)} = 100 - \frac{(\text{CHE} - \text{F})}{\text{CHE}} \times 100$$

CHE

Donde:

CHE = La Actividad de la Colinesterasa en la muestra determinada usando el reactivo que no contiene ni Dibucaina ni Fluoruro de sodio.

CHE - D = La Actividad de la Colinesterasa en la muestra determinada usando el reactivo que contiene 0.3 mMol/L de Dibucaina.

CHE - F = La Actividad de la Colinesterasa determinada usando el reactivo que contiene 40 mMol/L de Fluoruro de Sodio.

Actividad de Colinesterasa de Eritrocito:

La Actividad de la Colinesterasa del Eritrocito (ECHE) es calculada de los resultados obtenidos para la Actividad de la Colinesterasa del Eritrocito en plasma (HChE) y el valor del hematocrito (HCT) de la muestra

$$(\text{HChE}) = (\text{ECHE} \times \text{Het}^*) + (\text{PChE} \times (1 - \text{Het}^*))$$

$$\text{ECHE} = \frac{\text{HChE} - (\text{PChE} \times (1 - \text{Het}^*))}{\text{Het}^*}$$

*El valor del hematocrito es expresado como equivalente decimal.

LIMITES

1. A los sueros extremadamente lipémicos o ictericos se les debe realizar una corrección del blanco.
2. Este procedimiento no incluye a la Dibucaina o Fluoruro para estudios de resistencia.

CALIBRACION

Este procedimiento es calibrado por medio de la absorbancia milimolar del ácido 5-thio-2-nitrobenzoico, que es de 13.6 a 405 nm. El rango de linealidad de este reactivo varía dependiendo desde la muestra hasta la cantidad de reactivo. El límite tope de linealidad de acuerdo a este procedimiento es de 8,000 U/L con un cociente de la muestra al reactivo de 1:100.

CONTROL DE CALIDAD

1. Se recomienda que se incluyan valores altos y bajos de colinesterasa en cada juego de ensayos.
2. Se pueden usar materiales de control disponibles comercialmente con valores establecidos de colinesterasa.

Factor de Conversión de temperatura para Suero Humano:

	Temp. Deseada		
Temp. Ensayo	25	30	37
25	1.00	1.20	1.55
30	0.83	1.00	1.29
37	0.65	0.77	1.00

VALORES ESPERADOS

Se determinó el rango esperado de la actividad de colinesterasa en suero a 30°C de la siguiente forma:

Suero	3100 - 7700 U/L
Plasma	1700 - 4100 U/L
Sangre entera	3300 - 5500 U/L
Eritrocitos	4400 - 8200 U/L.

CARACTERISTICAS DE LA PRUEBA

1. *Linealidad:* 8000 IU/L a 30°C.
2. *Sensibilidad:* Un cambio de absorbancia de 0.001/min a 405 nm corresponde a 7.4 U/L de actividad de colinesterasa bajo las condiciones de este sistema de ensayo.
3. *Comparación:* Un estudio realizado entre el presente procedimiento y un producto comercial en sangre entera

condujo a un coeficiente de correlación de 0.96 con una regresión de $y = 1.00x - 103$ ($n = 20$) y en suero/plasma resultó un coeficiente de 0.99 con una regresión de $y = 0.96x + 63$ ($n = 47$).

4. Estudios de Precisión:

Dentro de la corrida		
<u>Promedio (U/L)</u>	<u>S.D.</u>	<u>C.V.(%)</u>
4539	173	3.8
3717	162	4.4

De corrida a corrida		
<u>Promedio (U/L)</u>	<u>S.D.</u>	<u>C.V.(%)</u>
4603	153	3.3
3760	151	4.0