Colinesterase liquiform

Instruções de Uso

Ref.: **139**

ANVISA 10009010167

Finalidade . Sistema para determinação da atividade da colinesterase (pseudocolinesterase ou colinesterase II) em amostras de soro ou plasma por reação cinética.

[Somente para uso diagnóstico in vitro.]

Princípio . A colinesterase (CHE) catalisa a hidrólise da butiriltiocolina, com formação de butirato e tiocolina. A tiocolina reduz o ferricianeto de potássio, de cor amarela, a ferrocianeto de potássio, que é praticamente incolor.

A redução da absorbância em 405 nm, conseqüente à redução do ferricianeto de potássio, é monitorada fotometricamente, sendo diretamente proporcional à atividade da colinesterase na amostra.

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

$$2\ \text{Tiocolina} + 2\ [Fe(CN)_6]^{3-} + 2\ OH^- \rightarrow \text{Ditiobis(colina)} + H_2O + 2\ [Fe(CN)_6]^{4-}$$

Características do sistema . A metodologia cinética para medição da atividade da colinesterase foi introduzida por Dietz *et al*[1] sendo posteriormente modificada pela *Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie (DGKC)*[2].

O sistema utiliza o substrato butiriltiocolina, que apresenta maior especificidade para a colinesterase II, minimizando a interferência da acetilcolinesterase (colinesterase I), presente em amostras hemolisadas.

Os reagentes são prontos para uso, facilitando sua aplicação em sistemas semi-automáticos e automáticos, capazes de realizar medições em modo cinético comprimento de onda de 405 nm.

Metodologia . Cinética - DGKC

Reagentes

1. R 1 - Reagente 1 - Armazenar entre 2 - 8 ºC.
Contém tampão pirofosfato 90 mmol/L e ferricianeto de potássio ≥2 mmol/L.

2. R 2 - Reagente 2 - Armazenar entre 2 - 8 ºC.
Contém butiriltiocolina ≥15 mmol/L.

Os reagentes não abertos, quando armazenados nas condições indicadas, são estáveis até a data de expiração impressa no rótulo. Após abertos, os reagentes devem ser manuseados de acordo com as boas práticas de laboratório para evitar contaminações de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

Precauções e cuidados especiais

Os cuidados habituais de segurança devem ser aplicados na manipulação dos reagentes.

Nos analisadores automáticos, os reagentes estão sujeitos a contaminações com outros reagentes ou com o ar ambiente, que dependem da característica do equipamento e das condições de trabalho. Essas contaminações podem resultar em redução da estabilidade dos reagentes ou modificações no seu desempenho.

Material necessário e não fornecido

1. Banho maria mantido à temperatura constante de 37 ºC.
2. Fotômetro com cubeta termostatizada a 37 ºC capaz de medir, com exatidão, a absorbância em 405 nm.
3. Pipetas para medir amostras e reagentes.
4. Cronômetro.
5. Calibrador - Linha Calibra H - Ref. 80, Labtest.

Amostra

Deve ser criado um Procedimento Operacional Padrão (POP) que estabeleça procedimentos adequados para colheita, preparação e armazenamento da amostra. Enfatizamos que os erros devidos à amostra podem ser muito maiores que os erros ocorridos durante o procedimento analítico.

Usar soro ou plasma (EDTA, Heparina). **Não utilizar anticoagulantes que contêm fluoreto, pois inibe a atividade da colinesterase**. A atividade enzimática permanece estável em amostras armazenadas durante 15 dias entre 2 - 8 ºC e 6 meses a 20 ºC negativos.

Como nenhum teste conhecido pode assegurar que amostras de sangue não transmitem infecções, todas elas devem ser consideradas como potencialmente infectantes. Portanto, ao manuseá-las, deve-se seguir as normas estabelecidas para biossegurança.

Para descartar os reagentes e o material biológico sugerimos aplicar as normas locais, estaduais ou federais de proteção ambiental.

Interferências

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

Para avaliar a concentração aproximada da hemoglobina em uma amostra hemolisada pode-se proceder do seguinte modo: Diluir 0,05 mL da amostra em 2,0 mL de NaCl 150 mmol/L (0,85%) e medir a absorbância em 405 ou 415 nm acertando o zero com água deionizada ou destilada.

Labtest

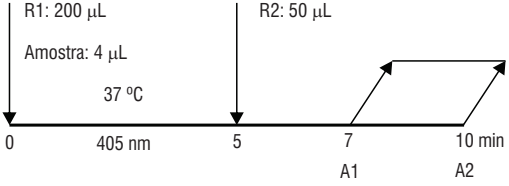
Hemoglobina (mg/dL) ≅ $Absorbância_{405}$ x 601

Hemoglobina (mg/dL) ≅ $Absorbância_{415}$ x 467

Procedimento

Parâmetros para analisadores automáticos

Parâmetros	Aplicação
Tipo de Reação	Cinética
Direção da Reação	Decrescente
λ primário	405 nm
λ segundário	700 nm
Temperatura	37 ºC
Calibração	2 pontos Ponto 0: Branco (Água deionizada/Salina) Ponto 1: Calibrador 1
Modelo da Calibração*	Linear
Volume de Amostra**	4 μL
Volume de R1**	200 μL
Volume de R2**	50 μL
Adição de R2	300 segundos após adição de R1 + amostra
Leitura 1 (Absorbância 1)	120 segundos após adição de R2
Leitura 2 (Absorbância 2)	300 segundos após adição de R2



*A definição de modelo de calibração deve ser adequada a cada modelo de equipamento. Em caso de dúvida entre em contato com o Serviço de Apoio ao Cliente Labtest.

**Os volumes de amostra e reagentes podem ser modificados proporcionalmente sem prejuízo para o desempenho do teste. Em caso de redução dos volumes é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a medição fotométrica.

Procedimento manual

Condições ótimas de reação:
Comprimento de onda: 405 nm;
Cubeta termostatizada a 37 ± 0,2 ºC com 1,0 cm de espessura de solução;
Banda de passagem ≤2 nm;
Luz espúria ≤0,1.

Tomar 2 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

Parte 1

	Teste	Calibrador
Amostra	0,02 mL	----
Calibrador*	----	0,02 mL
Reagente 1	1,0 mL	1,0 mL

*Aconselha-se utilização de calibrador Calibra H - Labtest.

Homogeneizar e incubar em banho maria a 37 ºC durante 3 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível do reagente nos tubos de ensaio.

Parte 2
Adicionar aos 2 tubos

	Teste	Calibrador
Reagente 2	+ 0,25 mL	+ 0,25 mL

1. Homogeneizar e transferir imediatamente para a cubeta termostatizada a 37 ± 0,2 ºC. Esperar 2 minutos.

2. Fazer a leitura da absorbância inicial (A_1) em 405 nm disparando simultaneamente o cronômetro. Repetir a leitura após 3 minutos (A_2).

Como ocorre em toda medição da atividade enzimática, a rigorosa observação do tempo e da temperatura de incubação é de grande importância para a qualidade dos resultados obtidos.

Para avaliar a linearidade da reação, registrar a absorbância com intervalos de 1 minuto e verificar se as diferenças de absorbância em cada minuto são equivalentes.

Os procedimentos sugeridos são adequados para fotômetros cujo volume mínimo de reação para medição é igual ou menor que 1,0 mL. Deve ser feita uma verificação da necessidade de ajuste do volume para o fotômetro utilizado. Os volumes de amostra e reagente podem ser modificados proporcionalmente sem prejuízo para o desempenho do teste e o procedimento de cálculo se mantém inalterado. Em caso de redução dos volumes é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a medição fotométrica. Volumes de amostra menores que 0,010 mL são críticos em aplicações manuais e devem ser usados com cautela porque aumentam a imprecisão da medição.

Cálculos . Como na maioria das vezes não é possível trabalhar sob condições ótimas de reação, as boas práticas de laboratório recomendam realizar a calibração do ensaio utilizando o calibrador indicado pelo fabricante do reagente. A Labtest indica o calibrador Calibra H - Ref. 80 para calibração do sistema COLINESTERASE Liquiform.

$\Delta A/minuto\ Teste\ ou\ Calibrador = (A_1 - A_2)/3$

$$Fator = \frac{Atividade\ do\ Calibrador}{\Delta A/min\ Calibrador}$$

$COLINESTERASE\ (U/L) = \Delta A/min\ Teste \times Fator$

Exemplo

Teste

$A_1 = 1{,}733$ $A_2 = 1{,}606$

$$\Delta A/\text{min Teste} = \frac{1{,}733 - 1{,}606}{3} = 0{,}042$$

Calibrador

$A_1 = 1{,}716$ $A_2 = 1{,}552$

$$\Delta A/\text{min Calibrador} = \frac{1{,}716 - 1{,}552}{3} = 0{,}055$$

Atividade do Calibrador (U/L) = 4100

$$\text{Fator} = \frac{4100}{0{,}055} = 74545$$

Atividade da COLINESTERASE (U/L) = 0,042 x 74545 = 3131 U/L

Quando são atendidas as condições ótimas de reação citadas anteriormente, pode-se optar pela utilização do fator 74400.

Calibração . Usar calibrador Calibra H - Ref. 80, Labtest.

Intervalo de calibrações
Quando o controle interno da qualidade indicar.
Quando utilizar novo lote de reagentes.
Quando utilizar novos frascos de reagentes de um mesmo lote, caso uma nova calibração tenha sido realizada durante a utilização do frasco anterior.

Intervalo operacional . O resultado da medição é linear entre 80 e 20000 U/L. Para valores maiores, diluir a amostra com NaCl 150 mmol/L (0,85%). Realizar nova medição e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

Controle interno da qualidade . O laboratório deve manter um programa de controle interno da qualidade que defina claramente os regulamentos aplicáveis, objetivos, procedimentos, critérios para especificações da qualidade e limites de tolerância, ações corretivas e registro das atividades. Materiais de controle devem ser utilizados para monitorizar a imprecisão da medição e desvios da calibração. Sugere-se que as especificações para o coeficiente de variação e erro total sejam baseadas nos componentes da variação biológica (VB)[3,4,5].

Intervalo de referência[6] . Estes valores devem ser usados apenas como orientação. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça seu próprio intervalo de referência na população atendida.

Adultos	Valores (U/L)
Mulheres	3930 - 10800
Homens	4620 - 11500

Conversão: Unidades Convencionais (U/L) x 16,7 = Unidades SI (nkat/L).

Características do desempenho[7]

Estudos de recuperação . Amostras com atividade de colinesterase conhecida foram testadas com o sistema COLINESTERASE Liquiform, obtendo-se os seguintes resultados:

Atividade (U/L)

Esperada	Encontrada	Recuperação (%)
12763	12967	101,6
3483	3616	103,7
2396	2471	103,1
1583	1533	103,2

O erro sistemático total médio obtido foi igual a 2,83%. O erro sistemático total obtido é menor que o erro sistemático total da especificação desejável baseada nos componentes da Variação Biológica que é ≤±4,8%.

Estudos de comparação de métodos . O método proposto foi comparado com outro produto de metodologia semelhante, sendo obtidos os seguintes resultados:

	Método Comparativo	Colinesterase Liquiform
Número de amostras	40	40
Intervalo de concentração (U/L)	1335 - 10356	1344 - 10297
Equação da regressão	Método Labtest = 0,9978x 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 3.000 U/L, 0,52% para uma amostra com atividade de colinesterase igual a 8.000 U/L e 0,39% para uma amostra com atividade de colinesterase igual a 14.000 U/L. Esses erros são menores que o erro sistemático analítico da especificação desejável baseada na variação biológica que é ≤±4,8%.

Estudos de precisão . Os estudos de precisão foram realizados utilizando amostras com valores de atividade iguais a 2881, 8080 e 13925 U/L.

Repetitividade - Imprecisão intra-ensaio

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	20	2881	39,8	0,59
Amostra 2	20	8080	27,4	0,35
Amostra 3	20	13925	44,3	0,36

Reprodutibilidade - Imprecisão total

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	20	2881	50,7	1,16
Amostra 2	20	8080	82,7	0,92
Amostra 3	20	13925	215,8	1,08

A imprecisão total obtida para as amostras atende a especificação desejável para imprecisão total baseada na variação biológica que é ≤3,1%.

O erro total (erro aleatório + erro sistemático) estimado em atividades de 2881, 8080 e 13925 U/L são iguais a 2,92, 2,04 e 2,17%, respectivamente.
Os resultados indicam que o método atende a especificação desejável para o erro total (≤±9,8%) baseada nos componentes desejável da Variação Biológica.

Sensibilidade metodológica . Uma amostra não contendo colinesterase foi utilizada para calcular o limite de detecção do ensaio tendo sido encontrado um valor igual a 76,3 U/L equivalente a média de 10 ensaios mais três desvios padrão.

Significado clínico[8] . O termo colinesterase refere-se a duas enzimas relacionadas: a acetilcolinesterase, chamada também de colinesterase verdadeira (EC 3.1.1.7) e a acilcolinesterase, chamada também de pseudocolinesterase ou colinesterase sérica (EC 3.1.1.8). A colinesterase verdadeira é encontrada nos eritrócitos, pulmões, baço, terminações nervosas e substância cinzenta do cérebro. A pseudocolinesterase é encontrada no fígado, pâncreas, coração, substância branca do cérebro e soro. Apesar de sua função biológica ser desconhecida, a pseudocolinesterase é a enzima clinicamente relevante.

Valores diminuídos de colinesterase no soro são relatados na hepatite aguda, hepatite crônica de longa duração, cirrose e carcinoma metastático. Inseticidas organofosforados também causam diminuição dos valores de colinesterase, devido à inibição direta da enzima. Portanto, em pessoas que entram em contato com organofosforados, o monitoramento dos níveis de colinesterase no soro é fundamental.

Existem pessoas com atividades reduzidas da enzima no soro devido à existência de diversos genes ligados à produção de colinesterase. Dependendo da combinação desses genes, os níveis de colinesterase podem variar desde os limites normais até zero. Portanto, conhecer o nível basal de colinesterase no soro de um indivíduo é importante para determinar sua sensibilidade a drogas que são quebradas por essa enzima, como os relaxantes musculares cloreto de suxametônio e mivacurium.

Valores ligeiramente aumentados de colinesterase são relatados em pacientes com síndrome nefrótica, tirotoxicose, hemocromatose, em pacientes diabéticos obesos e em pacientes com ansiedade e outros estados psíquicos.

Observações

1. A limpeza e secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.

2. O laboratório clínico tem como objetivo fornecer resultados exatos e precisos. A utilização de água de qualidade inadequada é uma causa potencial de erros analíticos. A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes, usar nas medições e para uso no enxágue final da vidraria, a água deve ter resistividade ≥1 megaohm.cm ou condutividade ≤1 microsiemens/cm e concentração de silicatos <0,1 mg/L.

Quando a coluna deionizadora está com sua capacidade saturada ocorre liberação de vários íons, silicatos e substâncias com grande poder de oxidação ou redução que deterioram os reagentes em poucos dias ou mesmo horas, alterando os resultados de modo imprevisível. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle da qualidade da água.

Referências

1. Dietz AA, Rubinstein HM, Lubrano T. Clin Chem 1973; 19(11):1309-1313.

2. Proposal of standard methods for the determination of enzyme catalytic concentrations in serum and plasma at 37 degrees C. II. Cholinesterase (acylcholine acylhydrolase, EC 3.1.1.8). Working Group of Enzymes, German Society for Clinical Chemistry. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1992; 30(3):163-170.

3. Ricos C, Desirable Specifications for Total Error, Imprecision, and Bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation. Disponível em: http://westgard.com/biodatabase1.htm (acesso em 10/09/2012).

4. Basques JC. Especificações da Qualidade Analítica. Labtest Diagnóstica 2005.

5. Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T. Clin Chem 1981; 27:493-501.

6. Recommendation of the German Society for Clinical Chemistry. Standardization of methods for the estimation of enzyme activities in biological fluids: Standard Method for the determination of Cholinesterase activity. JClin Chem Clin Biochem 1992;30:163-70.

7. Labtest: Dados de arquivo.

8. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994. p. 788-96.

Apresentação

Produto	Referência	Conteúdo	
Colinesterase Liquiform	139-1/30	R 1	1 X 24 mL
		R 2	1 X 6 mL

Para informações sobre outras apresentações comerciais consulte o site www.labtest.com.br ou entre em contato com o SAC.

Estão disponíveis aplicações para sistemas automáticos e semi-automáticos.

O número de testes em aplicações automáticas depende dos parâmetros de programação.

Informações ao consumidor

[Termos e Condições de Garantia]

A Labtest Diagnóstica garante o desempenho deste produto dentro das especificações até a data de expiração indicada nos rótulos, desde que os cuidados de utilização e armazenamento indicados nos rótulos e nestas instruções sejam seguidos corretamente.

Labtest Diagnóstica S.A.
CNPJ: 16.516.296/0001-38
Av. Paulo Ferreira da Costa, 600 - CEP: 33240-152
Lagoa Santa, Minas Gerais - Brasil - **www.labtest.com.br**
Serviço de Apoio ao Cliente | 0800 031 3411 (Ligação Gratuita)
e-mail: sac@labtest.com.br

Ref.: 171125(05)

Copyright by Labtest Diagnóstica S.A.
Reprodução sob prévia autorização

Símbolos utilizados com produtos diagnósticos in vitro

Símbolos usados con productos diagnósticos in vitro

Symbols used with IVD devices

Σ	**Conteúdo suficiente para < n > ensaios** Contenido suficiente para < n > ensayos Sufficient content for < n > trials		**Risco biológico** Riesgo biológico Biological risk
	Prazo de validade (aaaa-mm-dd ou mm/aaaa) Fecha de expiración (aaaa-mm-dd o mm/aaaa) Expiration date (yyyy-mm-dd or mm/yyyy)		**Corrosivo** Corrosivo Corrosive
	Limite de temperatura (conservar a) Temperatura limite (conservar a) Temperature limit (store at)		**Tóxico** Tóxico Poison
EC REP	**Representante Autorizado na Comunidade Europeia** Representante autorizado en la Comunidad Europea Authorized Representative in the European Community	CE	**Marca CE** Marcado CE CE Mark
	Carcinogênico/mutagênico e/ou sensibilizante à respiração Carcinogénico/mutagénico y/o sensibilizante respiratorio Carcinogenic/mutagenic and/or respiratory sensitizer		**Atenção** Atención Attention
	Tóxico para os organismos aquáticos Tóxico para los organismos acuáticos Toxic for aquatic organisms		**Data de fabricação** Fecha de fabricación Date of manufacture
	Gases/líquidos comburentes Gases/líquidos oxidantes Oxidizing gases/liquids		**Fabricante** Fabricante Manufacturer
	Substância inflamável Sustancia inflamable Flammable substance	LYOPH	**Liofilizado** Liofilizado Lyophilized
	Período após abertura Período post-abertura Period after-opening	LOT	**Número do lote** Denominación de lote Batch code
	Produto de uso único Producto de un solo uso Single use product	REF	**Número do catálogo** Número de catálogo Catalog Number
	Consultar instruções de uso Consultar instrucciones de uso Consult instructions for use	CONTROL	**Controle** Control Control
CAL	**Material Calibrador/Padrão** Material Calibrador/Estándar Calibrator/Standard Material	CONTROL –	**Controle negativo** Control negativo Negative control
IVD	**Dispositivo médico de diagnóstico in vitro** Dispositivo médico para diagnóstico in vitro In vitro diagnostic medical device	CONTROL +	**Controle positivo** Control positivo Positive control
M	**Reagente contendo microparticulas** Reactivo con microparticulas Reagent with microparticles	R R	**Reagente** Reactivo Reagent
UDI	**Identificador único do dispositivo** Identificador único del dispositivo Unique device identifier	PT	**Pré-Tratamento** Pretratamiento Pre-Treatment
STRIP	**Cartucho contendo reagente** Cartucho que contiene reactivo Cartridge containing reagent	IN	**Instalar até** Instalar hasta Install before

Ref.: 031125

Labtest