

CHOLINESTERASE

REF 1119005

1x 55 mL

CONTENIDO

R1.Reactivo 2 x 25 mL

R2.Reactivo 1 x 2 mL

R3.Reactivo 1 x 3 mL

Sólo para uso diagnóstico *in vitro*

COLINESTERASA

TOTAL E INHIBIDA

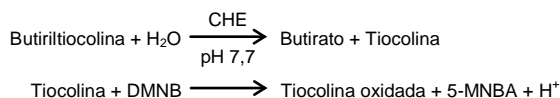
Método enzimático colorimétrico

CINETICO

FUNDAMENTO

La colinesterasa (CHE) cataliza la hidrólisis del sustrato butiriltiocolina formando butirato y tiocolina. Esta última reduce el ácido 5,5'-mercaptobis-2-nitrobenzoico (DMNB) a 5-mercapto-2-nitrobenzoate (5-MNBA), un compuesto coloreado.

La reacción se controla cinéticamente a 405 nm a partir de la velocidad de formación del color amarillo producido, proporcional a la actividad CHE en la muestra¹.



La inhibición por la dibucaina se efectúa mediante un ensayo en paralelo en el que se halla presente la dibucaina en el sustrato, evaluándose el porcentaje de inhibición por comparación con la actividad colinesterásica total presente en el sustrato no tratado. El número de dibucaina resultante permite la clasificación e identificación de las variantes homo y heterocigóticas.

COMPOSICION DE LOS REACTIVOS

R1 **Tampón/Cromógeno.** Tampón fosfatos 50 mmol/L pH 7,7, DMNB 0,25 mmol/L. Polvo.

R2 **Sustrato.** Yoduro de butiriltiocolina 7 mmol/L. Liofilizado.

R3 **Dibucaina.** Clorhidrato de dibucaina 2,6 mmol/L.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

 Conservar a 2-8°C.

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Mantener los frascos cerrados, protegidos de la luz y evitar la contaminación durante su uso.

Descartar si se observan signos de deterioro:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Los reactivos **R1** y **R2** si presentan una vez reconstituidos una absorbancia del Blanco (A) a 405 nm > 0,700 frente a agua destilada en cubeta de 1 cm.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS

Reactivos de trabajo

- Tampón/Cromógeno.** Añadir 25 mL de agua destilada a un vial de **R1**. Tapar. Agitar. Reposar 15 min. antes de su empleo. Estable 6 semanas a 2-8°C.
- Sustrato.** Añadir 2,0 mL de agua destilada a un vial de **R2**. Mezclar. Estable 6 semanas a 2-8°C. El sustrato en exceso puede congelarse una vez.
- Reactivo inhibidor.** Mezclar 9 volúmenes de Tampón/Cromógeno con 1 volumen de **R3**.

MUESTRAS

Suero o plasma recogido con EDTA o heparina. Una hemólisis moderada no interfiere.

La colinesterasa en suero o plasma es estable varias semanas tanto a temperatura ambiente como refrigerada y durante 3 meses a -20°C.

INTERFERENCIAS

- Lipemia (intralipid), 20 g/L no interfiere.
- Bilirrubina, 40 mg/dL no interfiere.
- Hemoglobina, 16 g/L no interfiere.
- Otros medicamentos y sustancias pueden interferir⁴⁻⁵.

EQUIPO ADICIONAL

- Fotómetro o colorímetro con compartimiento de medición termostatado a 25/30/37°C, para leer a 405 nm.
- Cronómetro, registrador gráfico o impresora.
- Cubetas de 1-cm de paso de luz.
- Pipetas de volumen variable para reactivos y muestras.

TECNICA

- Preincubar los reactivos de trabajo y muestras a la temperatura de reacción (ver NOTAS).
- Ajustar a 0 el fotómetro con agua destilada.
- Pipetear en cubetas rotuladas:

Temperatura	25/30°C		37°C	
	Sin inhibidor	Con inhibidor	Sin inhibidor	Con inhibidor
Tampón/Cromógeno	1,5 mL	-	1,5 mL	-
Reactivo Inhibidor	-	1,5 mL	-	1,5 mL
Muestra	10 µL	10 µL	-	-
Muestra dil. 1:2 con sol. salina	-	-	10 µL	10 µL
Sustrato	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL

- Mezclar suavemente por inversión. Insertar la cubeta en el compartimiento termostatado del instrumento, poner el cronómetro en marcha y anotar la absorbancia inicial.
- Repetir las lecturas exactamente a los 30,60 y 90 segundos.
- Calcular la diferencia entre absorbancias.
- Calcular el promedio de los resultados para obtener el cambio promedio en absorbancia por segundo ($\Delta A/30\text{seg}$).

CALCULOS

Colinesterasa total

$$U/L = \Delta A / 1 \text{ min} \times 23111 \text{ (37°C)}$$

$$U/L = \Delta A / 30 \text{ seg} \times 46222 \text{ (37°C)}$$

$$U/L = \Delta A / 30 \text{ seg} \times 23111 \text{ (25/30°C)}$$

Muestras con ΔA superiores a 0,250 a 405 nm deben diluirse 1:10 con solución salina y repetir el ensayo. Multiplicar los resultados por 10.

Para expresar los resultados en unidades SI aplicar:
U/L x 16,67 = nkat/L

Colinesterasa inhibida

Para expresar el número de dibucaina aplicar:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \left[1 - \frac{U/mL \text{ con inhibidor}}{U/mL \text{ sin inhibidor}} \right] \times 100$$

VALORES DE REFERENCIA

Colinesterasa total³

Suero, plasma

Niños Hombres y mujeres > (40 años)	3,5-8,5 KU/L (58,3-141,7 μ kat/L)
Mujeres, (16-39 años) No embarazadas.	2,8-7,4 KU/L (46,7-123,3 μ kat/L)
Mujeres, (18-41) años Embarazadas o tomando anticonceptivos	2,4- 6,0 KU/L (40,0-100,0 μ kat/L)

Colinesterasa inhibida

Número de dibucaina	% Inhibición
Homocigotos normales	70-90
Sujetos heterocigotos	35-75
Homocigotos atípicos	0-20

CONTROL DE CALIDAD

Para un control de calidad adecuado se incluirán en cada serie controles valorados (normales y elevados) que se tratarán como muestras problema.

REF 1980005 HUMAN MULTISERA NORMAL
Valorado. Nivel normal de colinesterasa.

REF 1985005 HUMAN MULTISERA ABNORMAL
Valorado. Nivel elevado de colinesterasa.

Si los resultados obtenidos se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y la técnica usada. Cada laboratorio debe establecer su propio Control de Calidad y sus medidas correctoras cuando los controles no cumplan con las tolerancias exigidas.

SIGNIFICADO CLINICO

La colinesterasa sérica (CHE) se la denomina pseudocolinesterasa para distinguirla de la colinesterasa verdadera (AcCHE) de los hematíes y del tejido nervioso.

Los niveles de colinesterasa en suero se han empleado como prueba de la función hepática, como indicador frente a un posible envenenamiento por insecticidas y para la detección de pacientes con formas atípicas del enzima. Como medida de la función de la enfermedad hepática no aporta más que las técnicas comúnmente empleadas en el laboratorio. Sin embargo, es un parámetro muy sensible al envenenamiento por inhalación o contacto con compuestos organofosforados que inhiben la actividad colinesterásica. Entre ellos, insecticidas orgánicos como el Paration, Sarin y tetraetilpírofosfato⁴.

El control genético de la actividad colinesterásica sérica tiene su importancia práctica al haberse reconocido dos formas de enzima. Una denominada "normal" y otra denominada "atípica". Los individuos homocigotos para el gen "atípico" pueden fácilmente distinguirse de los homocigotos "normales". El homocigoto anormal tiene niveles muy bajos de colinesterasa y el enzima anormal no es inhibido por la dibucaina. El homocigoto normal presenta niveles mucho más altos de colinesterasa sérica inhibible por la dibucaina, mientras que el heterocigoto tiene niveles intermedios y respuesta al inhibidor. Este hecho posee una importancia clínica en relación a la administración de relajantes musculares (succinilcolina). Los homocigotos anormales pueden desarrollar una apnea prolongada tras la administración de succinilcolina.

NOTAS

1. El **Tampón/Cromógeno** y el **Sustrato** pueden mezclarse proporcionalmente en tests o en analizadores que empleen el suero como iniciador de la reacción. La mezcla es estable 2 horas a 15-25°C.
2. Este ensayo permite ser adaptado a distintos instrumentos automáticos. Cualquier adaptación a un instrumento deberá ser validada con el fin de demostrar que se cumplen las características analíticas del método. Se recomienda validar periódicamente el instrumento. Consultar con su distribuidor para cualquier dificultad en la adaptación del método.
3. El diagnóstico clínico no debe realizarse únicamente con los resultados de un único ensayo, sino que debe considerarse al mismo tiempo los datos clínicos del paciente.

CARACTERISTICAS ANALITICAS

- **Límite detección:** 244 U/L
- **Linealidad.** Hasta 10000 U/L
- **Precisión**

g/dL	Intraserial		Interserial	
Media	5,11	8,01	5,11	8,01
DE	0,04	0,106	0,091	0,227
CV%	0,79	1,36	1,78	2,84
N	10	10	10	10

- **Sensibilidad.** 0,08 mA / U/L colinesterasa.

- **Correlación.** Este ensayo (y) fue comparado con un método comercial similar (x). Los resultados fueron los siguientes:

$$N = 50 \quad r = 0,995 \quad y = 0,987x - 0,005$$

Las características analíticas han sido generadas usando un instrumento automático. Los resultados pueden variar según el instrumento utilizado.

REFERENCIAS

1. Knedel, M. y Böttger. Klin. Wschr. 45 : 325 (1967).
2. Poppe, W.A. y Tritsler. J. Clin: Chem. Biochem. 21 : 381 (1983).
3. Clinical Chemistry. Kaplan, L.A. y Pesce, A.S. The C.V. Mosby Co. 3rd Ed. (1996).AACC
4. Tietz. N.W. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3th Edition. W.B. Saunders Co. Philadelphia, PA.1995.
5. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed Press, 2000.