

Método
Cinético (DGKC).

Finalidade
Sistema para a determinação da atividade da colinesterase em amostras de soro e plasma por reação cinética.
Somente para uso diagnóstico in vitro.

Princípio
O método DGKC utiliza butiriltiocolina como substrato específico para Colinesterase. A Colinesterase catalisa a hidrólise do substrato de butiriltiocolina formando butirato e tiocolina. A tiocolina reduz o hexacianoferrato (III) para hexacianoferrato (II). A diminuição na absorbância é diretamente proporcional à atividade de Colinesterase na amostra.

Significado Clínico
Colinesterase (ChE) sérica (pseudocolinesterase ou colinesterase II, EC3.1.1.8) é achada primariamente no fígado, mas também na substância branca do cérebro, pâncreas, coração e soro. Níveis de ChE séricos podem ser determinados como um indicador de envenenamento hepático por inalação ou com contato com a pele por alguns compostos organofosforados (incluindo alguns inseticidas ou gases neurológicos), em doenças hepáticas, ou antes de anestesias com succinilcolina assim para eliminar uma deficiência congênita dessas enzimas que poderiam levar a uma apneia prolongada devido a degradação lenta do miorelaxante. Uma diminuição de 15 - 25% é observada em envenenamento leve, uma diminuição de 25 - 35% é observada em um envenenamento moderado, uma diminuição de 30 - 50% é observada em um envenenamento grave, mas também é observada em pacientes com hepatites graves ou crônicas. Uma diminuição de 50 - 70% ocorre em pacientes com cirrose avançada e carcinoma de metástase no fígado.

Reagentes

Reagente nº 1 - Tampão - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Pirofosfato (pH 7,60), Hexacianoferrato de Potássio (III) e Azida Sódica 0,5 g/L.

Reagente nº 2 - Substrato - Conservar entre 2 e 8°C. Contém: Butiriltiocolina e Azida Sódica 0,5 g/L. (pH 4,0).

Estabilidade, Condições de Armazenamento e Transporte

Os reagentes são estáveis até a data de validade impressa no rótulo do produto e na embalagem externa quando conservados na temperatura recomendada, bem vedados e se evitado a contaminação durante o uso. A temperatura de armazenamento deverá ser de 2 a 8°C. Os produtos não deverão exceder as temperaturas entre 2 e 30°C por até 120 horas (5 dias) para fins de transporte. **Não congelar.**

Cuidados Especiais e Precauções

- As amostras a serem analisadas devem ser tratadas como material potencialmente infectante.
- Utilizar os EPI's de acordo com as Boas Práticas de Laboratório Clínico.
- O Tampão (1) e o Substrato (2) contêm azida sódica que é tóxica e irritante para pele e mucosa.
- As informações de Descarte, Segurança e Primeiros Socorros estão descritas na Ficha Individual de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) deste produto, disponível em www.bioanalitica.com.br ou pelo telefone 0800 006 8111.
- Reagentes de lotes diferentes não devem ser misturados.
- Não trocar as tampas dos frascos dos reagentes, a fim de evitar contaminação cruzada.
- Não utilizar os reagentes quando se apresentarem turvos.
- Evitar deixar os reagentes fora das condições de armazenamento especificadas, quando os mesmos não estiverem em uso.
- O tempo de reação, pipetagens e temperatura de trabalho são muito importantes para obtenção de resultados corretos.
- Usar pipetas de vidro e ponteiras descartáveis específicas para cada amostra, controle, padrão/calibrador e reagente.
- O nível de água do banho-maria deve ser superior ao dos tubos de ensaio que contém as reações.

Materiais Necessários e Não Fornecidos

- Analisador bioquímico automático, semiautomático ou espectrofotômetro;
- Pipetas de vidro e/ou automáticas;
- Ponteiras, estantes;
- Cronômetro;
- Tubos de ensaio;
- Banho-maria.

Amostra

Soro ou plasma (EDTA/Heparina). A Colinesterase é estável por 14 dias se conservada em temperatura de 2 a 8°C, quando livres de contaminação. Para descarte dos reagentes e materiais biológicos devem-se seguir as normas locais, estaduais ou federais de proteção ambiental.

Interferências e Limitações

Concentrações de bilirrubina até 43,2 mg/dL, triglicérides até 1216 mg/dL, ácido ascórbico até 20 mg/dL e hemoglobina até 655 mg/dL não produzem interferências significativas.

Preparação dos Reagentes

Reagente líquido pronto para uso.

Procedimento Técnico

Equipamentos Automáticos

Para determinação em equipamento automático, verificar no site www.bioanalitica.com.br

A Bioanalítica recomenda, para uso do kit, utilizar como soro controle os produtos Controle N - Ref. BA115, Controle P - Ref. BA118 e o Calibrador - Ref. BA052 para a calibração.

	Branco	Amostra/Calibrador
Amostra	---	20 µL
Água destilada	20 µL	---
Tampão (1)	1000 µL	1000 µL
	Homogeneizar e incubar durante aproximadamente 3 minutos a 37°C.	
Substrato (2)	250 µL	250 µL

Homogeneizar novamente, incubar por exatamente 2 minutos a 37°C e ler a absorbância (405 nm). Medir a mudança de absorbância por minuto ($\Delta A/min$) após 1, 2 e 3 minutos exatos.

CÁLCULOS

Considerando caminho ótico de 1 cm e a temperatura de reação 37°C, o cálculo será:

$$\Delta A/min \text{ Amostra/Calibrador} = (A_1 - A_2) / 3$$

$$\Delta A/min = \frac{(A_1 - A_0) + (A_2 - A_1) + (A_3 - A_2)}{3}$$

Exemplo:

$$A_0 = 0,883 \quad A_1 = 0,915 \quad A_2 = 0,952 \quad A_3 = 0,984$$

$$\Delta A/min = \frac{(0,915 - 0,883) + (0,952 - 0,915) + (0,984 - 0,951)}{3}$$

$$\Delta A/min = 0,034$$

Quando se é possível trabalhar sob as condições de reação descrita, usa-se o fator de calibração: 189,807.

$$\text{Atividade da Colinesterase (U/L)} = 0,034 \times 189,807 = 6543$$

Caso não seja possível trabalhar sob as condições de reação, pode-se obter o fator de calibração para seu equipamento utilizando o Calibrador Ref. BA052 da Bioanalítica.

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

$$\text{Atividade Colinesterase (U/L)} = \Delta A / \text{min} \times \text{Fator}$$

Exemplo de cálculo do Fator:

$$\Delta A \text{ Calibrador} = 0,026 \quad \text{Atividade do Calibrador (U/L)} = 4935$$

$$\text{Fator} = \frac{4935}{0,026} = 189.807$$

Características do Desempenho

Comparação de Métodos

O método foi comparado com outro produto com metodologia semelhante através de 40 amostras de soro humano. Através de modelos estatísticos, os resultados foram analisados e resultaram na equação de regressão linear onde Método Bioanalítica (y) = 231,022 + 0,933 * Método comparativo (x) e coeficiente de correlação igual a 0,994.

Sensibilidade

Uma amostra proteica não contendo colinesterase, foi utilizada para calcular o limite de detecção do ensaio. A média encontrada foi 43,15 U/L equivalente a 20 determinações, com desvio padrão de 4,98 U/L. A sensibilidade, que indica o limite de detecção do método, corresponde à média mais 3 vezes o desvio padrão, que é igual a 58,09 U/L.

Linearidade

A reação é linear de 60 a 20000 U/L. Para amostras com valores acima de 20000 U/L, diluir a amostra com Cloreto de Sódio 150 mmol/L (0,85%), repetir a dosagem e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

Repetitividade

A repetitividade foi calculada a partir de 20 determinações sucessivas, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração Média (U/L)	2600,6	3739,4	7085,1
Desvio Padrão (U/L)	28,31	9,91	6,86
Coeficiente de Variação (%)	1,09	0,26	0,10

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi calculada a partir de 20 determinações sucessivas durante 20 dias consecutivos, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração Média (U/L)	2599,9	3741,4	7085,1
Desvio Padrão (U/L)	31,82	7,58	6,35
Coeficiente de Variação (%)	1,22	0,20	0,09

Valores de Referência

Estes valores de referência devem ser usados apenas como orientação. Sugere-se que cada laboratório estabeleça seus próprios valores para população atendida. Os resultados dos testes devem ser analisados por um profissional responsável.

Valores Normais	37°C
HOMENS	5600 – 11200 U/L
MULHERES	4200 - 10800 U/L

Em crianças menores de 6 meses, a atividade da colinesterase é de 40% a 50% maior que em adultos. A atividade diminui durante a gravidez.

Controle Interno da Qualidade

O laboratório clínico deve possuir um programa interno de controle da qualidade, para assegurar que todos os procedimentos, normas, limites e tolerância para variações sejam claramente definidos. Ressaltamos que todos os sistemas de medição apresentam uma variabilidade analítica, que deve ser monitorada pelos laboratórios. Portanto, é recomendável a utilização de controles, que permitem avaliar a precisão e a exatidão das dosagens. Sugere-se utilizar soluções estabilizadas da linha de controles e calibradores da Bioanalítica.

Observações

- A limpeza e secagem adequadas do material usado são fatores fundamentais para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
- A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de agentes contaminantes. A limpeza da vidraria deve ser feita com detergente neutro. O enxágue deve ser exaustivo sendo os últimos com água destilada ou deionizada.
- A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes e usar nas medições, a água deve ser do Tipo II, com resistividade > 1 megaohms/ cm ou condutividade < 1 microsiemens /cm e concentração de silicatos < 0,1 mg/L. Para o enxágue inicial da vidraria, a água pode ser do Tipo III, com resistividade > 0,1 megahoms ou condutividade < 10 microsiemens.

No enxágue final, utilizar água do Tipo II. Coluna deionizadora com sua capacidade saturada libera água alcalina, vários íons e também substâncias com grande poder de oxidação ou redução que deterioram os reagentes em poucos dias ou mesmo horas, alterando de maneira imprevisível os resultados. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle da qualidade da água.

Referências Bibliográficas

- TIETZ, Textbook of Clinical Chemistry, 2 ed, Burtis-Ashwood, 1994.
- NCCLS. Procedures for the Collection of Arterial Blood Specimens; Approved Standard, 3 ed, 1999.
- KAPLAN, L.A., PESCE, A.J. Clinical Chemistry, Mosby ed., 1996.
- EU-Dir Commission Directive of 8 March 1999 adapting to technical progress the principles of Good Laboratory Practice as specified in Council Directive EEC. v. 87, 1999.
- JAKOBS, et al. Laboratory Test Handbook, Lexi-Comp and Williams & Wilkins, 2 ed.1990.
- GESELLSCHAFT, D. Proposal of Standard Methods for the determination of enzyme catalytic concentrations in serum and plasma at 37°C. II Cholinesterase (acylcholine acylhydrolase, EC 3.1.1.8). Eur.J.Clin.Chem.Clin.Biochem 30,163,1992.
- Bioanalítica: Dados internos de arquivo do P&D.

Termos e Condições de Garantia

A Bioanalítica Diagnóstica garante o desempenho e a qualidade deste produto, dentro das especificações, até a data de expiração indicada nos rótulos, desde que utilizados, armazenados e transportados nas condições adequadas.

Apresentações

Ref.	Volume	Reagente 1	Reagente 2
BA091-25	25 mL	1 x 20 mL	1 x 5 mL

Bioanalítica Diagnóstica S/A.

Rua Álvares da Silva, 12 - União
 CEP: 31160-360 – Belo Horizonte MG - Brasil
 Tel. +55 31 3657-0051
www.bioanalitica.com.br
 E-mail: bioanalitica@bioanalitica.com.br
 CNPJ: 20.264.948/0001-61 – Indústria Brasileira
 SAC: 0800 006 8111
 E-mail: sac@bioanalitica.com.br

Revisão: Outubro / 2022.