

**FINALIDADE**

Sistema colorimétrico para determinação da colinesterase sérica (pseudocolinesterase) no soro ou plasma (heparina).

**Somente para uso diagnóstico in vitro.**

**PRINCÍPIO**

A colinesterase sérica hidrolisa Propioniltiocolina, com a liberação de grupo sulfidrílico livre ao nível de Tiocolina (equação 1). O grupo SH livre reage com DTNB (reagente de cor) levando à formação de um composto amarelo, de absorção máxima em torno de 410nm (equação 2).

**PARTICULARIDADES DO SISTEMA**

**Doles Reagentes** apresenta um método simples para dosagem da colinesterase sérica, realizado em 5 minutos.

**METODOLOGIA**

Dietz modificado.

**REAGENTES**

**Substrato:** cada frasco contém, sob forma liofilizada, 67µmol de Iodeto de Propioniltiocolina.

**Reagente de cor:** solução 0,423M de 5,5-Dithiobis-(Ácido 2-Nitronzóico) em tampão de fosfatos pH 7,6.

**Solução inibidora:** solução de Sulfato de Quinidina a 0,5%.

**Solução padrão 7U.I./mL:** 20µL do padrão corresponde a 7U.I./mL dentro da metodologia adotada.

**APRESENTAÇÃO**

Substrato	6 x 6,5mL
Reagente de cor	1 x 120mL
Solução inibidora	1 x 110mL
Solução padrão 7U.I./mL	1 x 3mL

**NÚMERO DE TESTES**

18 testes	20µL de soro
36 testes	10µL de soro

**EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS**

- Espectrofotômetro ou fotocolorímetro capaz de medir a absorvância em 410nm ou filtro azul.
- Tubos de ensaio.
- Pipetas graduadas.
- Pipetas semiautomáticas 20 µL.
- Banho maria (37°C).
- Cronômetro.
- Ponteiras descartáveis.
- Água deionizada ou destilada.

**ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES**

**Substrato (liofilizado):** armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco. Após a reconstituição, o reagente permanece estável por 30 dias, à temperatura de 2-8°C.

**Reagente de cor:** armazenar à temperatura de 2-8°C e ao abrigo da luz, pois o reagente de cor é fotosensível. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco.

**Solução inibidora:** armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco.

**Solução padrão 7U.I./mL (liofilizado):** armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco. Após a reconstituição o padrão permanece estável por 30 dias, se mantido congelado.

**CUIDADOS E PRECAUÇÕES COM O USO DOS REAGENTES**

Todos os reagentes são somente para **uso diagnóstico in vitro**. Seu manuseio deve ser cuidadoso, evitando-se contato com pele e mucosas. Em caso de contaminação acidental, lavar a parte afetada em água corrente. O descarte do material utilizado deverá ser feito obedecendo-se aos critérios de biossegurança estabelecidos pelo laboratório, de acordo com as normas locais estaduais ou federais.

Observar ainda a simbologia constante nos rótulos do produto:



Irritante

**AMOSTRA**

Soro ou plasma (heparina). **Não usar amostras hemolisadas, pois as hemácias são ricas em acetilcolinesterase.** Estável por 7 dias, se armazenada entre 2-8°C.

**Todas as amostras biológicas devem ser consideradas como potencialmente infectantes.**

**PROCEDIMENTO TÉCNICO****Preparo do substrato para uso:**

Adicionar 6,5mL de água destilada ou deionizada ao frasco que contém o liofilizado. O reagente permanece estável por 30 dias, à temperatura de 2-8°C.

**Preparo do padrão para uso:**

Reconstituir a solução com a adição de 3mL de água destilada. O padrão permanece estável por 30 dias, se mantido congelado.

**Determinação do Fator**

Rotular um tubo de ensaio com **B (branco)** e 3 tubos de ensaio com **P (padrão)**.

**Proceder como segue:**

	<b>B</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>
<b>Água destilada</b>	4,0mL	4,0mL	4,0mL	4,0mL
<b>Solução padrão</b>	-	20µL	20µL	20µL
<b>Reagente de cor</b>	3,0mL	3,0mL	3,0mL	3,0mL

Homogeneizar e ler as absorvâncias do **T (teste)** em espectrofotômetro ou fotocolorímetro, em **410nm** ou **filtro azul**, acertando o zero com o **branco**.



## Determinação da Amostra

1- Identificar 2 tubos de ensaio com B (branco) e T (teste).

### Proceder como segue:

	B	T
Substrato	1,0mL	1,0mL
Reagente de cor	3,0mL	3,0mL

Colocar em banho-maria, 37°C, durante 3 minutos.

2-Manter a estante dentro do banho maria. Adicionar 20µL de amostra no **tubo T** e incubar durante 2 minutos e 30 segundos. O intervalo de adição e homogeneização deve ser de 30 segundos entre os tubos.

**Atenção! Este tempo deve ser cronometrado a partir do 1º tubo em que foi adicionado a amostra. A contagem do tempo a partir do último tubo levará a resultados falsamente elevados. Note que tal ocorrência é diretamente proporcional a quantidade de amostra da bateria de ensaio.**

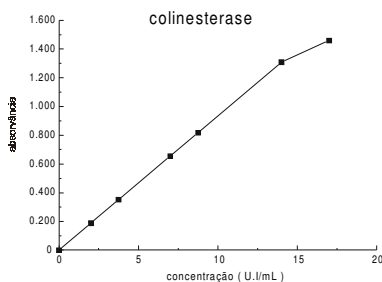
3- Após o tempo de incubação e ainda no banho-maria adicionar 3mL de solução inibidora no **tubo T** em intervalos de 30 segundos entre os tubos.

4-Retirar a estante de tubos do banho-maria e adicionar 3mL de solução inibidora e 20µL de amostra no **tubo B**.

**Para o tubo B não há necessidade de cronometrar o intervalo de adição de reagentes, visto que não há atividade da enzima neste tubo. O mesmo é preparado com a finalidade de eliminar interferentes de aspecto físico (icterícia, lipemia, entre outros) da amostra.**

5-Homogeneizar e ler as absorvâncias do **T (teste)** em espectrofotômetro ou fotocolorímetro, em **410nm** ou **filtro azul**, acertando o zero com o **branco**. A cor final permanece estável por 15 minutos, à temperatura ambiente (20-30°C). Após a leitura vide item cálculos.

### CURVA DE CALIBRAÇÃO



Padrão	Absorvância	Conc. (U.I./mL)
1	0.000	0
2	0.187	2
3	0.351	3.75
4	0.654	7
5	0.818	8.75
6	1.308	14
7	1.460	17

**Obs.: Não utilizar esta curva para determinar o resultado de seu ensaio.**

• A curva de calibração é a representação gráfica da relação entre os valores das absorvâncias com os valores das concentrações de um conjunto de soluções padrão. São necessários três passos para confeccioná-la: (1) preparo das soluções padrão; (2) medição dos valores de absorvância das soluções padrão, de acordo com o especificado no procedimento técnico da presente instrução de uso, e (3) montagem de um gráfico, em papel especial, linear, onde são relacionados os valores de absorvância com os de concentração, conforme demonstrado na figura acima.

As dosagens para montagem da curva foram feitas em um espectrofotômetro "Ultrospec III", Pharmacia Biotec, comprimento de onda de 410nm e cubetas com passagem de luz de 10mm.

• A curva de calibração demonstra a linearidade da reação até uma determinada concentração, na qual pode ser determinado um fator de calibração (F) de acordo com a Lei de Beer. As curvas de calibração são utilizadas para substituir os cálculos matemáticos na determinação das concentrações das amostras. A leitura da amostra é localizada no gráfico apropriado e a concentração correspondente determinada a partir da curva. Tal procedimento será válido se a leitura da amostra estiver no intervalo da linearidade da reação.

• **A reação é linear até 14 U.I./mL (ver curva acima). Obtendo-se valores mais elevados, dilui-se a amostra com solução fisiológica e procede-se à nova dosagem. Multiplicar o valor encontrado pelo fator de diluição.**

• **O kit de Colinesterase Doles possui padrão no intervalo de linearidade da metodologia adotada. O laboratório deve realizar o ensaio com o padrão que acompanha o kit e calcular seu fator de calibração (F), de acordo com o exemplo estabelecido nos cálculos.**

• **O fator deve ser refeito periodicamente e a cada lote do produto.**

• Os padrões utilizados na montagem da curva de calibração foram standardizados seguindo o descrito em: "Colorimetric Determination of Serum Cholinesterase and Its Genetic Variants by the Propionylthiocholine - Dithiobis (nitrobenzoic Acid) Procedure", Dietz A.A. e colaboradores in "Selected Methods of Clinical Chemistry" vol. 08, 1977 - American Association for Clinical Chemistry.

### CÁLCULOS

$$\text{Fator (F)} = \frac{7}{\text{absorvância P(média)}}$$

$$\text{Colinesterase (U.I./mL)} = T \times \text{Fator (F)}$$

Exemplo:

Leitura:

Padrão: 0,651; 0,656; 0,654

Teste : 0,700

$$\text{Média padrão} = \frac{0,651 + 0,656 + 0,654}{3} = 0,654$$

$$F = \frac{7}{0,654} = 10,70$$

$$\text{Colinesterase (U.I./mL)} = 0,700 \times 10,7 = 7,5$$

### EXPRESSÃO DOS RESULTADOS EM UNIDADES S.I.

Colinesterase (U.I./L) = Colinesterase (U.I./mL) x 1000

**Uma U.I. de Colinesterase é a quantidade de enzima que hidrolisa um µmol de substrato/minuto/mL de soro, 37°C.**

### LIMITAÇÕES DO SISTEMA

• Para se obter ótimo desempenho do sistema, é necessário que o procedimento técnico seja rigorosamente seguido conforme instruções de uso. Qualquer alteração poderá levar a resultados errôneos.

• Não usar amostras hemolisadas pois os eritrócitos são ricos em AChE.

• O controle de tempo de incubação (2 minutos e 30 segundos) deve ser feito com um cronômetro. Uma diferença de 15 segundos leva a um erro de 10% na dosagem da colinesterase.



## CONTROLE DA QUALIDADE DO SISTEMA

1. A limpeza e a secagem adequada do material a ser utilizado são de fundamental importância para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
2. A água utilizada na limpeza do material, no preparo dos reagentes e na dosagem, deve ser de boa qualidade.
3. Colunas deionizadoras saturadas liberam íons diversos, aminas e agentes oxidantes, que deterioram os reagentes.
4. As pipetagens devem ser precisas.
5. O nível da água do banho-maria deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio. A temperatura (37°C) deve ser rigorosamente observada.
6. O uso de soro controle de referência deve ser uma prática rotineira do laboratório. Recomenda-se utilizar um soro controle com valor na faixa de normalidade e outro soro controle de valor elevado.

## VALORES DE REFERÊNCIA

Sexo feminino	5,0 - 10,5 U.I./mL
Sexo masculino	6,1 - 12,1 U.I./mL

## SIGNIFICADO CLÍNICO

A colinesterase sérica ou pseudo colinesterase, é sintetizada pelo fígado. Tem apreciável valor quando dosada no sangue de indivíduos suspeitos de hepatopatia, pelo fato de encontrar-se diminuída em todas afecções hepáticas parenquimatosas difusas como: hepatite virótica, cirrose, neoplasma maligno metastático, fígado cardíaco e necrose amebiana do fígado. Não é, porém, método específico, pois pode estar diminuída na desnutrição, nas anemias, no enfarto do miocárdio, nas infecções ou na gravidez (10-15% abaixo da faixa normal).

Na intoxicação por inseticidas organofosforados, a colinesterase sérica encontra-se diminuída, sendo esta a principal indicação clínica para sua dosagem.

## CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Foram realizados 44 testes em amostras cujos teores de colinesterase situavam-se no intervalo de 1,3 a 13,5 U.I./mL. Esses ensaios foram realizados em paralelo com uma metodologia de referência. A comparação do kit de Colinesterase Doles (Y) com a metodologia mencionada (X) deu origem à seguinte equação de regressão linear:  $Y = 1,213X - 1,46$ , sendo o coeficiente de correlação 0,999. Testes mostram recuperação entre 96 e 104%. O erro da média foi de 2,28%.

**Repetitividade:** foram realizadas 20 dosagens sucessivas, com 2 amostras, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2
Concentração (U.I./mL)	1,64	8,51
Desvio padrão	0,05	0,20
Coefficiente de variação (%)	3,04	2,35

**Reprodutibilidade:** foram realizadas 20 dosagens, durante 20 dias consecutivos, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2
Concentração (U.I./mL)	1,53	8,98
Desvio padrão	0,05	0,27
Coefficiente de variação (%)	3,27	3,00

**Especificidade:** a presente metodologia é específica para determinação da colinesterase.

**Sensibilidade:** a absorvância encontrada, de 0,005, corresponde a 0,4U.I./mL de colinesterase, quando realizados os testes em espectrofotômetro, a 410nm. A sensibilidade do sistema está diretamente relacionada com a do aparelho utilizado no laboratório.

**Diluição da matriz:** estudos sucessivos de diluição da matriz mostraram que não há interferência na sensibilidade diagnóstica na metodologia de Dietz modificado.

**Substâncias interferentes:** não utilizar amostras hemolisadas pois as hemácias são ricas AChE.

## BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Gary, P.G.: *Cholinesterase determination. Clin. chem.* 17, 1145, 1971.
- Dietz A.A., Rubinstein, H.M. and Lubrano T.: *Colorimetric determination of serum cholinesterase and its genetic variant by the propionylthiocholine-dithiobis (nitrobenzoic acid) procedure. Clin. Chem.* 19, 1309, 1973.
- Prellwitz, Kapp and Müller: *Aktivitätsbestimmung der serum cholinesterase J. Clin. chem. biochem.* 14, 93, 1976.
- Bishop M.L.; Dubin - Engelkirk J.L.; Fody E.P.: *Clinical chemistry principles, procedures and correlation*, 2ª edição, 238-239, 1991.
- Lima A. O., Soares J.B.; Greco J.B.; Galizzi J.; Cançado J.R.: *Métodos de laboratório aplicados à clínica*, 7ª edição, 3-6, 1992.
- Burtis C.A., Ashwood: *Tietz textbook of clinical chemistry*, 2ª edição, 877-882, 1994.
- Tibúrcio, H.M.: *Controle interno da qualidade analítica*, 1ªed. março/1995.
- Doles : dados de arquivo.

## TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

As garantias do fabricante ao consumidor seguem estritamente as relacionadas na Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1.990 - **Código de Defesa do Consumidor**. Todos os reagentes que compõem este sistema para diagnóstico são garantidos na sua performance, reprodutibilidade e qualidade até a data de vencimento dos mesmos, se obedecidas as condições abaixo:

1. O usuário do sistema seguir, rigorosamente, o procedimento técnico.
2. As condições de armazenamento deverão estar de acordo com o estabelecido nas instruções de uso.
3. Os materiais necessários e não fornecidos deverão estar em boas condições técnicas.

**Todos os produtos que apresentarem problemas técnicos comprovados serão substituídos, sem ônus para o consumidor.**

Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda.  
CNPJ: 01.085.513/0001-05  
Rodovia BR 153, Km 1273, Lt.07, Chácara Retiro  
Caixa Postal 1051  
CEP: 74001-970 Goiânia - GO - Brasil  
email: doles@doles.com.br  
www.doles.com.br

M.S.: nº 10231810016

Revisão: 12 (06/2009)

## NBR ISO 9001

**Sistema da Qualidade  
certificado desde 1999**

