

COLINESTERAZA

TOTALA SI INHIBATA

Metoda colorimetrica enzimatica

CINETIC

Numai pentru testarea *in vitro*

CONTINUT

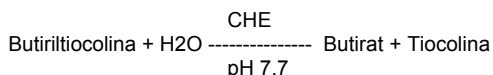
1119005 COLINESTERAZA 30 teste

REF

PRINCIPIUL

Colinesteraza (CHE) catalizeaza substratul hidrolozei butiriltiocolinice formand butirat si tiocolina. Tiocolina reduce acidul 5,5-mercaptopis- 2-nitrobenzoic (DMNB) la %-mercapto-2- nitrobenzonat (5-MNBA), un compus colorat.

Reactia este monitorizata kinetic la 405 nm de catre rata de formare a culorii galbene formate, proportional cu activitatea CHE-ului din proba.



Inhibarea dibucainei poate fi estimate efectuand analize asemanatoare in care dibucaina este prezenta in substratul mixturii. Inhibarea de verificare este evaluata prin compararea activitatii din sistemul inhibat cu cea din sistemul inhibat. Numarul dibucainei ce a rezultat permite clasificarea si identificarea variantelor de CHE.

CONSTITUENTI SI COMPOZITIE

- **R1 CHE Buffer Tampon** Fosfatat 50 mmol/L pH 7.7
- **R2 CHE Substrat/cromogen.** 5-butiltiocolina iodata 7 mmol/L, DMNB 0.25 mmol/L in test. Tablete.
- **R3 CHE inhibitor** HCl dibucaina 2.6 mmol/L

CONSERVARE SI STABILITATE

Se pastreaza la o temperaturi de 2-8°C.
Reactivii sunt stabili pana la data de valabilitate scrisa pe eticheta.

PREPARAREA REACTIVULUI

Reactiv de lucru. Adaugati o tableta din **R2** intr-o fiola de **R2**. Amestecati usor pentru a se dizolva continutul. Nu agitate. Protejati de lumina.

Stabil timp de 2 ore la o temperature de 2-8°C

Reactiv inhibitor Adaugati in fiola reactivului inhibitor 300 µL de **R3**. Amestecati.

PROBE

Ser sau plasma heparinica. Hemoliza moderata nu intervine. Colinesteraza in ser sau plasma este stabile timp de cateva saptamani in cazul in care specimenul este pastrata la temperature camerei sau in frigider, sit imp de 3 luni la o temperature de -20°C

INTERFERENTE

- Probele de la pacientii care au capatat apnee dupa tratamentul cu succinilcolina nu ar trebui sa beneficieze de tratament decat dup ace paralizia a trecut; metabolismul drogului par sa intervin in analiza
- A fost publicata o lista de droguri si substante care produc schimbari in nivelele de colinesteraza sau intervin in determinarea acestuia

MATERIALE DE LUCRU

- Fotometrul si spectrofotometrul cu un compartiment pentru termostat setat la 25/30/37°C, capabil sa citeasca la 405 nm
- Ceas de laborator
- Cuvete cu o pant ade inclinare de 1 cm
- Pipete pentru masurarea reactivilor si peobelor

METODA DE LUCRU

1. Preincubati reactivii de lucru si perobe la temperature reactiei
2. Setati fotometrul la o absorbanta 0 cu apa distilata
3. Pipetati in cuvele cu eticheta:

Temperatura	25/30°C		37°C	
Tratament	Fara inhibitor	Cu inhibitor	Fara Inhibitor	Cu inhibitor
Reactiv de lucru	3.0 mL	--	3.0 mL	--
Reactiv inhibitor	--	3.0 mL	--	3.0 mL
Proba	20 µL	20 µL	--	--
Proba	--	--	10 µL	10 µL

4. Agitati usor . Insetati cuveta in suport, dati drumul la ceasul de llaborator si notati absorbanta initiala.
5. Repetati citirea absorbantei exact dupa 30, 60 si 90 de secunde.
6. Calculati diferentele ce exista intre absorbante.
7. Calculati media rezultatelor pentru a obtine valoarea medie a schimbului absorbantei pe secunda ($\Delta A/30$ sec)

METODA DE CALCUL

Total colinesteraza

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

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

Probe cu $\Delta A/30$ sec atingand 0.250 la 405 nm ar trebui sa fie diluate 1:10 cu solutie salina si analizata din nou. Multiplicati rezultatul cu 10.

In cazul in care rezultatele trebuie sa fie exprimate in unitati SI se aplica:

$$\text{Procent inhibitor} = \left(1 - \frac{U/mL \text{ inhibitor}}{U/mL \text{ fara inhibitor}} \right) \times 100$$

VALORI DE REFERINTA

Total colinesteraza

Ser, plasma

Copii. Barbati si femei > (40 ani)	Procent inhibitor
Femei care nu sunt gravide, Ce nu iau contraceptive	70-90
Femei, (18-41) Gravide sau iau contraceptive	35-75
Homozigot atipic	0-20

Instrument: COBAS MIRA

Replicate**: 10 pentru fiecare nivel timp de 8 zile

Numarul dibocainei	Procent inhibitor
Homozigot normal	70-90
Probe de heterozigot	35-75
Homozigoti atipici	0-20

Sensitivitate. Folosind acest reagent si aceasta metoda un $\Delta A/30$ sec cu 0.010 citire la 405 nm este echivalentul a 1,36 U/L activitate de colinesteraza.

Corelare. Aceasta analiza (y) a fost comparata cu o metoda comerciala similara (x). Rezultatele au fost:

$$N = 25 \quad r = 0.993 \quad y = 0.95x + 1.02$$

NOTA

Compusul ionic/Cromogen si Substrat pot sa fie mixate proportional in teste si analizatori folosind serul ca un punct de inceput. Amestecul este stabil timp de 2 ore la o temperatura de 15-25°C.

CONTROL DE CALITATE

Pentru a asigura un control de calitate adecvat (QC), fiecare ar trebui sa include un set de controale (normal si anormal) cu valorile analizelor trecute ca fiind neafiate.

1980005 MULTISER UMAN NORMAL

NIVEL DE COLINESTERAZA SCAZUT. ANALIZA

REF

1985005 MULTISER UMAN ANORMAL

NIVEL DE COLINESTERAZA ALCALINA
CRESCUT. ANALIZA

REF

SEMNIFICATIA MEDICALA

Colinesterazei din ser (CHE) i se mai spune pseudocolinesteraza pentru a face diferenta dintre aceasta si acetilcolinesteraza (AcCHE) a celulelor rosii si tesuturilor nervoase.

Nivelul de colinesteraza in ser a fost folosit drept test pentru determinarea functiilor ficatului, ca indicator in cazul unei otraviri cu insecticid si pentru descoperirea acelor pacienti la care apar forme atipice de enzime. In cazul masurarii functiei bolii de ficat acesta pare sa usureze putin masurarile de laborator. In orice caz, CHE este un parametru sensibil in detectarea gradului de otravire prin inhalare sau contact cu compusii de fosfor organic ce inhiba activitatea colinesterazei. Printre acestia se mai numara si multe alte insecticide organice, cum ar fi Parationul, Sarinul si tetratipirofosfatul.

Controlul genetic al activitatii serului CHE are si o importanta practica printre altele. Doua forme de ser CHE au fost recunoscute. Una a fost numita "normala" si cealalta "atipica". Indivizii homozigoti in cazul genei "atipice" se pot distinge clar de cei cu homozigot "normal". Homozigotul anormal are un nivel scazut de CHE si nu este inhibat de dibucaina. Homozigotul normal are un nivel mult mai mare de ser de colinesteraza si este inhibat de dibucaina, in timp ce heterozigotul are nivele si raspunsuri intermediare la inhibitori. Acest fapt are o importanta clinica in ceea ce priveste administratia de tranchilizant muscular (sucinilcolina). Homozigotul anormal poate sa dezvolte o apnee prelungita dupa ce primește sucinilcolina.

NOTA

Compusul ionic/Cromogen si Substrat pot sa fie mixate proportional in teste si analizatori folosind serul ca un punct de inceput. Amestecul este stabil timp de 2 ore la o temperatura de 15-25°C.

PERFORMANTELE ANALIZEI

Linearitate . Pana la 10 KU/L (37°C)

Precizie.

KU/L	In timpul analizelor*			Intre analize**		
Mean	4.1	6.8	140	4.1	6.8	140
SD	40.1	100.8	130.1	43.5	107.1	129.6
CV%	0.98	1.48	0.93	1.06	1.56	0.86
N	10	10	10	10	10	10

Replicate*: 10 pentru fiecare nivel.